MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI ÎNVĂȚĂMÎNTULUI
SOCIETATEA DE ȘTIINȚE BIOLOGICE

Prof. dr. ION ANGHEL
Lector dr. CONSTANTIN VOICA
Biolog. pr. dr. GHEORGHE MOHAN
Conf. dr. MARIN ANDREI
Lector dr. NICOLAE TOMA
Prof. gr. I. A. TALABA

PRACTICUM DE BIOLOGIE

Coordonarea lucrării:
Prof. dr. I. ANGHEL
Lector dr. C. VOICA

BUCUREȘTI
1988

MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI ÎNVĂȚĂMÎNTULUI
SOCIETATEA DE ȘTIINȚE BIOLOGICE

Prof. dr. ION ANGHEL
Lector dr. CONSTANTIN VOICA
Biolog. pr. dr. GHEORGHE MOHAN
Conf. dr. MARIN ANDREI
Lector dr. NICOLAE TOMA
Prof. gr. I. A. TALABA

PRACTICUM DE BIOLOGIE

I. BIOLOGIE VEGETALĂ

Coordonarea lucrării:
Prof. dr. I. ANGHEL
Lector dr. C. VOICA

BUCUREȘTI
1988

CUPRINS

PREFAȚA (Prof. dr. I. Anghel) 7

1. ÎNDRUMĂRI PRACTICE PRIVIND ÎNTOCMIREA COLECȚIILOR DE MATERIALE BOTANICE (Lector dr. N. Toma) 9

1.1. *Herbarizarea, prepararea și întocmirea herbarelor* 9

1.1.1. Scurt istoric 9

1.1.2. Tipuri de herbare 11

1.1.3. Alcătuirea herbarelor 12

1.1.4. Montarea plantelor pe coli herbare 23

1.1.5. Conservarea herbarelor 25

1.2. Exponate muzeistice 27

1.2.1. Preparate anatomice uscate 27

1.2.1.1. Uscarea prin presare 27

1.2.1.2. Deshidratarea liberă 27

1.2.1.3. Uscarea plantelor în nisip 28

1.2.2. Preparate anatomice injectate 29

1.2.3. Preparate anatomice conservate în lichide 29

2. MEDII DE MONTARE A PREPARATELOR MICROSCOPICE (Lector dr. N. Toma) 33

3. TEHNICA ÎNTOCMIRII PREPARATELOR MICROSCOPICE BOTANICE (Lector dr. N. Toma) 39

3.1. *Obținerea unor preparate de Talofite* 40

3.1.1. Preparate de alge albastre-verzi (Cyanobacterii) 41

3.1.2. Preparate de diatomee (Bacillariophyceae) 42

3.1.3. Preparate de alge verzi (Chlorophyta) 42

3.1.4. Preparate de alge brune (fil. Phaeophyta) și roșii (fil. Rhodophyta) 44

3.1.5. Preparate de ciuperci (fil. Fungi-Mycophyta) 45

3.1.5.1. Preparate de mucegaiuri (Mucor, Rhyzopus, Aspergillus, Penicillium) 46

3.1.5.2. Preparate de ciuperci faliicole 46

4. MICROSCOPIE ȘI MICROFOTOGRAFIE (biolog pr. dr. G. Mohan) 48

4.1. *Descrierea microscopului* 48

4.2. *Întreținerea microscopului* 62

4.3. *Funcționarea microscopului* 62

4.4. *Utilizarea microscopului optic sau fotonic* 63

4.5. *Tipuri de microscoape optice și fotonice* 63

4.6. *Aparatură fotografică și materialele necesare* 63

4.6.1. Laboratorul fotografic 64

4.6.2. Aparatura de microfotografiere 66

4.6.2.1. Microfotografierea la microscopul universal de cercetare MC-1 . . 68

4.6.2.2. Microfotografierea cu Microscopul D.16 B (ROW) 70

4.6.2.3. Microfotografierea cu ajutorul tubului foto 71

4.6.2.4. Alte dispozitive pentru fotografierea la microscop 73

4.7. *Substanțe chimice utilizate în laboratorul fotografic* 76

4.8. *Microfotografia* 77

4.8.1. Factorii fotografici 77

4.8.1.1. Sursa de lumină (iluminarea) . . . 77
4.8.2. Alegerea sistemului optic . . . 79
4.8.3. Filtrele pentru microfotografiere . . . 80
4.8.4. Determinarea timpului de expunere . . . 81
4.8.5. Grosismentul microfotografiei . . . 81
4.8.6. Practica microfotografierii . . . 82
4.8.7. Microfotografia în cimp întunecat (cu fond negru) . . . 83
4.8.8. Microfotografia în contrast de fază . . . 85
4.8.9. Microfotografia în lumină polarizată . . . 89
4.8.10. Microfotografia în lumină fluorescentă . . . 92
4.8.11. Dispozitivele pentru microfotografiere . . . 96
4.8.12. Microfotografia în infraroșu . . . 96
4.8.13. Microfotografia în cazul luminii incidente . . . 102

5. TEHNICA EXECUTĂRII DESENELOR (Lector dr. N. Toma) . . 103
5.1. *Noțiuni de micrometrie* . . . 104

6. FIXATORI ȘI METODE DE FIXARE (Prof. dr. I. Anghel) . . 108
6.1. *Introducere în tehnica fixării* . . . 108
6.2. *Proprietățile fizico-chimice ale unor fixatori citologici* . . . 114
6.2.1. Fixatori primari coagulanți . . . 114
6.2.2. Fixatori primari necoagulanți . . . 117
6.3. *Tehnici de preparare și utilizare a fixatorilor citologici* . . . 125

7. COLORANȚI ȘI METODE DE COLORARE (Prof. dr. I. Anghel) . 136
7.1. *Introducere în tehnica colorării* . . . 136
7.1.1. Afinitatea chimică . . . 140
7.1.2. Densitatea coloranților . . . 143
7.1.3. Penetrația coloranților . . . 143
7.2. *Tehnici de preparare și utilizare a coloranților citohistologici* . . . 144

8. REALIZAREA UNOR PREPARATE CITO-HISTOLOGICE DE CORMOPHYTAE (Lector dr. N. Toma) . . . 156
8.1. *Metoda includerii în parafină* . . . 163

9. TEHNICI DE INVESTIGARE A CELULELOR VEGETALE (Lector dr. N. Toma) . . . 172
9.1. *Evidențierea plasmalemei și tonoplasmei* . . . 172
9.2. *Evidențierea vacuolelor* . . . 173
9.3. *Curenții plasmatici* . . . 173
9.4. *Evidențierea unor organite celulare* . . . 176
9.4.1. Mitocondriile . . . 177
9.4.2. Plastidele . . . 178
9.4.2.1. Cloroplastele . . . 178
9.4.2.2. Cromoplastele . . . 181
9.4.2.3. Leucoplastele . . . 183
9.5. *Tehnici de evidențiere a incluziunilor ergastice* . . . 184
9.5.1. Amidonul . . . 185
9.5.2. Inulina . . . 187
9.5.3. Lipidele . . . 187
9.5.4. Aleurona . . . 188
9.5.5. Cristalele de oxalat de calciu . . . 189
9.6. *Teste citochimice de evidențiere a unor constituenți parietali* . . . 190
9.6.1. Îngroșări locale . . . 191
9.6.2. Punctuațiuni și plasmodesme . . . 192

10. METODE PENTRU STUDIUL MITOZEI, MEIOZEI ȘI AL CROMOZOMILOR LA PLANTELE SUPERIOARE (Prof. dr. I. Anghel) . . 194
10.1. *Metode pentru studiul cromozomilor în mitoză și meioză* . . . 194
10.1.1. Metoda rapidă Feulgen de colorare cu fuxină bazică leuco . . . 194
10.1.2. Metoda de colorare cu carmin acetic . . . 199
10.1.3. Metode de colorare cu orceină acetică . . . 199
10.1.4. Metoda de colorare cu resorcină acetică . . . 199

10.1.5. Metoda de colorare cu nigrosină acetică 200
10.1.6. Studiul cromozomilor cu ajutorul fluorocromilor 200
10.1.7. Colorarea diferențiată cu soluție Giemsa 201
10.2. *Studiul meiozei la plante* 202
10.2.1. Efectuarea preparatelor microscopice 203
10.3. *Studiul cariotipului la plante* 208
10.3.1. Cariotipul la *Secale cereale* 216
10.3.2. Cariotipul la *Allium cepa* 216
10.3.3. Cariotipul la *Aloë barbadense* 217
10.4. *Metode pentru determinarea duratei ciclului mitotic* 217
10.4.1. Metoda obținerii unei populații sincrone de celule tetraploide . 219
10.4.2. Metoda microautoradiografiei cu timidină marcată cu ^3H . . 220

11. TEHNICI DE INDUCERE ȘI IDENTIFICARE A POLIPLOIZILOR (prof. dr. I. Anghel, prof. gr. I. A. Talabă) 222

11.1. Introducere 222
11.2. Tehnici de inducere a poliploidiei 224
11.3. Tehnici de identificare a poliploizilor 238
11.3.1. Numărul de cloroplaste în stomate 240
11.3.2. Dimensiunea și numărul de stomate 242

12. STRUCTURA ORGANELOR VEGETATIVE (Conf. dr. M. Andrei) . . 248

12.1. *Plantula* 248
12.2. *Structură primară a rădăcinii* 253
12.2.1. Structura rădăcinii la Monocotyledonae 258
12.2.1.1. Secțiunea transversală prin rădăcina de *Iris germanica L* . . 258
12.3. *Structura secundară a rădăcinii* 260
12.3.1. Secțiune transversală prin rădăcina de *Ranunculus sp.*, *Caltha palustris* 261
12.4. *Structura primară a tulpinii* 262
12.4.1. Structura primară a tulpinii la Dicotyledonae 262
12.4.1.1. Structura primară a tulpinii la *Ranunculus repens* 263
12.4.1.2. Structura primară a tulpinii la monocotyledonae 273
12.5. *Structura secundară a tulpinii* 279
12.5.1. Secțiunea transversală prin tulpina de *Helianthus annuus* . . . 280
12.5.2. Secțiune transversală prin tulpina de *Tilia sp.* 274
12.6. *Structura frunzei* 275
12.6.1. Secțiune transversală prin frunza de *Pinus nigra L* 276
12.6.2. Secțiune transversală prin frunza de *Fagus sylvatica* 278
12.6.3. Secțiune transversală prin frunză de *Lavandula sp.* 279
12.6.4. Secțiune transversală prin frunza de Zea mays L. 280

13. EXPERIENȚE DE FIZIOLOGIE VEGETALĂ (Lector dr. C. Voica) 283

13.1. *Fiziologia celulei* 283
13.1.1. Osmoza prin membrane permeabile 283
13.1.2. Osmoza prin membrane semipermeabile 284
13.1.3. Plasmoliza și deplasmoliza 284
13.1.4. Măsurarea presiunii osmotice cu ajutorul soluțiilor izotonice . . 285
13.1.5. Măsurarea forței de sucțiune a celulelor din parenchimul tuberculului de cartof (metoda Pringsheim) 285
13.1.6. Determinarea forței de sucțiune a țesuturilor vegetale prin metoda curenților (metoda Sardakov) 287
13.2. *Regimul de apă al plantelor* 288
13.2.1. Localizarea absorbției apei prin rădăcini 288
13.2.2. Determinarea cantității de apă absorbită prin rădăcini 288
13.2.3. Absorbția apei prin frunze 289
13.2.4. Determinarea intensității transpirației cu ajutorul patometrelor . 290
13.2.5. Determinarea intensității transpirației prin metoda colorimetrică Stahl 291
13.2.6. Determinarea intensității transpirației prin metoda gravimetrică . 292
13.2.7. Evidențierea gutației 292
13.2.8. Evidențierea conducerii apei prin vasele de lemn 293
13.2.9. Punerea în evidență a presiunii radiculare 293

13.2.10. Eidențierea rolului transpirației în conducerea apei în corpul plantei 294
13.3. *Nutriția minerală a plantelor* 295
13.3.1. Identificarea rapidă a principalelor îngrășăminte minerale . . . 295
13.3.2. Culturi de plante pe medii solide umectate cu soluții minerale nutritive 297
13.4. *Fotosinteza* 299
13.4.1. Punerea în evidență a fotosintezei prin metoda bulelor 299
13.4.2. Punerea în evidență a amidonului produs în fotosinteză 299
13.4.3. Evidențierea necesității prezenței pigmenților asimilatori pentru desfășurarea procesului de fotosinteză 300
13.4.4. Evidențierea necesității prezenței CO_2 pentru desfășurarea fotosintezei 300
13.4.5. Separarea pigmenților asimilatori prin metoda cromatografiei pe hîrtie 301
13.4.6. Determinarea intensității fotosintezei prin metoda manometrică Warburg 302
13.4.7. Determinarea intensității fotosintezei la frunzele plantelor aeriene prin metoda manometrică (N. Sălăgeanu) 307
13.4.8. Determinarea intensității fotosintezei după cantitatea de dioxid de carbon consumat 309
13.4.9. Influența factorilor externi asupra intensității fotosintezei 310
13.4.9.1. Influența intensității luminii 310
13.4.9.2. Influența compoziției spectrale a luminii asupra intensității fotosintezei 311
13.4.9.3. Influența concentrației de CO_2 asupra intensității fotosintezei . . 311
13.4.9.4. Influența temperaturii asupra intensității fotosintezei 311
13.5. *Respirația plantelor* 312
13.5.1. Evidențierea schimbului de gaze caracteristic respirației 312
13.5.2. Determinarea intensității respirației prin metoda Boysen-Jensen . . 312
13.5.3. Punerea în evidență a respirației anaerobe la plantele superioare . . 314
13.5.4. Evidențierea fermentației alcoolice 314
13.6. *Creșterea plantelor* 315
13.6.1. Determinarea facultății și energiei germinative 315
13.6.2. Corelația dintre cantitatea de endosperm a semințelor și creșterea plantelor 316
13.6.3. Aflarea poziției zonelor de creștere la diferite organe prin metoda diviziunilor cu tuș 317
13.6.3.1. Zona de creștere la rădăcină 317
13.6.3.2. Zona de creștere la tulpinile nearticulate 317
13.6.3.3. Zona de creștere la frunze 318
13.6.4. Măsurarea creșterii cu microscopul orizontal 318
13.7. *Mișcările plantelor* 319
13.7.1. Curenții protoplasmatici 319
13.7.2. Geotropismul 319
13.7.3. Fototropismul 320
13.7.4. Chimiotropismul rădăcinilor 321
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ 322

PREFAȚĂ

Manualul PRACTICUM DE BIOLOGIE, conține metode și tehnici de laborator, care se pot folosi în procesul de predare a diferitelor discipline biologice.

Am considerat util ca aceste tehnici, unele prezentate în diferite lucrări, în aceeași redactare sau într-o nouă redactare să fie reunite într-un singur manual, pentru a ușura activitatea de documentare și efectuarea lucrărilor practice de laborator sau a practicii productive.

Învățământul românesc a traversat în ultimele două decenii o perioadă de profunde transformări și readaptări înnoitoare, într-un proces continuu aflat sub semnul unei temeinice integrări cu activitatea productivă. Integrarea organică a învățământului cu cercetarea științifică, producția și activitatea social-culturală, presupune îngemănarea celor trei componente ale activității sociale, educația, cercetarea și producția — într-un sistem unitar, astfel încît fiecare unitate de învățămînt să devină în procesul de pregătire a tineretului studios, în același timp o unitate de cercetare și producție. În modul acesta se realizează o simbioză între pregătirea teoretică și cea practică, elevul și studentul, fiind pregătiți în cadrul unui proces complex în care laboratorul, cîmpul experimental, școala se îmbină în mod armonios.

Revoluția tehnico-științifică, la care sîntem în egală măsură martori și participanți, solicită o solidă pregătire de cultură generală și practică, indiferent de domeniul în care vor lucra actualii elevi și studenți — industrie, agricultură, construcții, sănătatea publică, care-i dă posibilitatea să-și desăvîrșească pregătirea profesională, să contribuie în perspectivă la progresul tehnic și la obținerea unor rezultate la nivelul actualelor și viitoarelor exigențe.

Însușirea în cele mai bune condiții a cunoștințelor de biologie, mereu mai complexe și diverse se poate realiza numai dacă cunoștințele teoretice sînt însoțite de demonstrații practice și deplasări pe teren.

Pentru a sprijini procesul de perfecționare și modernizare a învățămîntului biologic, Societatea de Științe Biologice a inițiat elaborarea și publicarea acestui manual de lucrări practice, util deopotrivă profesorilor și elevilor.

Introducerea practicii productive în învățămîntul românesc de toate gradele s-a dovedit a fi o orientare științifică de o deosebită importanță pentru integrarea acestuia cu cercetarea și producția.

În concepția actuală, practica productivă reprezintă o componentă principală a procesului de instruire profesională, științifică a elevilor și

studenților, o modalitate de perfecționare a cunoștințelor teoretice și practice însușite în cadrul procesului de învățămînt, sau de însușirea unor noi tehnici de investigație și producție.

Prin activitatea productivă pe care o desfășoară elevii și studenții, se urmărește în același timp, formarea deprinderilor de muncă independentă, educarea prin muncă și pentru muncă.

Ne exprimăm convingerea că manualul PRACTICUM DE BIOLOGIE își va dovedi utilitatea și va contribui la desfășurarea în mai bune condiții a procesului de instruire și a activităților productive.

Exprimăm cele mai alese mulțumiri prof. gr. I. A. Talabă, pentru amabilitatea, promtitudinea și competența cu care a acceptat să analizeze conținutul lucrării și să testeze posibilitatea folosirii tehnicilor în cadrul lecțiilor sau cercurilor de biologie.

Mulțumim tuturor celor care vor avea amabilitatea să citească acest manual și care prin sugestiile lor vor contribui la îmbunătățirea următoarelor ediții.

Prof. dr. I. ANGHEL
Președintele Societății de Științe Biologice

1. ÎNDRUMĂRI PRACTICE PRIVIND ÎNTOCMIREA COLECȚIILOR DE MATERIALE BOTANICE

Fiecare colțișor al patriei noastre constituie o sursă inepuizabilă din care poate fi colectată o gamă largă de materiale biologice ; el nu ne oferă însă în orice moment materialul didactic demonstrativ necesar în predarea științelor biologice sau pentru realizarea tematicii de cercetare. În consecință, pe măsură ce el apare în natură, trebuie colectat, conservat și inclus în colecție. În general, colecțiile botanice se pot realiza sub două forme : de herbare și de exponate muzeistice.

1.1. HERBORIZAREA, PREPARAREA ȘI ÎNTOCMIREA HERBARELOR

„Herbarium necessarium est omni botanico" (K. Linné)

Predarea unor discipline biologice ca morfologia, anatomia și taxonomia plantelor, fitopatologia, fitocenologia, ecologia ș.a. nu poate fi concepută fără utilizarea unui material botanic conservat. Cel inclus într-un herbar are o importanță primordială, așa încît el trebuie să existe în fiecare laborator școlar de biologie. *Herbarul* — (lat. herba = iarbă, plantă) — este o colecție de plante uscate prin presare, aranjate pe coli speciale și ordonate în funcție de tematica acestuia.

Aceeași denumire este dată și instituției, clădirii sau încăperii în care sînt depozitate, clasate, întreținute și completate colecțiile de plante uscate (herbarele).

1.1.1. SCURT ISTORIC

Plantele, componentă principală a biosferei, au constituit dintotdeauna, pentru om, cea mai importantă sursă nutritivă și de materie primă pentru diferitele ramuri ale economiei. Existența umană este indisolubil legată, de lumea vegetală ; de aceea, încă de la apariția sa, omul a căutat să cunoască plantele. Mărturie sînt gravurile, desenele și picturile străvechi ale celor mai utile plante comestibile, medicinale, furajere ș.a. Cu mult mai tîrziu au apărut herbarele. Începutul este marcat de Evul mediu, cînd, îndeosebi călugării, colectau de la plante numai florile pe care le presau între filele cărților de rugăciuni, unde în con-

tinuare erau păstrate. Astfel s-a realizat prima presă de plante și astfel a apărut primul herbar. Unele se mai păstrează și azi, având, în primul rînd, o deosebită valoare istorică. Dintre cele mai vechi herbare menționăm pe cele ale unor pasionați naturaliști și medici ca: William Turner (1538), Aldrovandi (1554), Hireonimus Harder (1562), Cesalpino (1563) ș.a. Un mare și valoros herbar a fost și cel al lui Petru I (1689—1725), dar care a ars în anul 1912. Merită de asemenea a fi menționat micul herbar al lui Areskin (1680), medicul lui Petru I, care cuprinde circa 200 plante medicinale, reprezentînd una dintre cele mai valoroase piese ale Muzeului Botanic al Academiei de Științe din Moscova.

Din marile călătorii întreprinse în jurul globului, constant însoțite și de naturaliști, s-au adus, printre altele și bogate colecții de plante. Ca urmare, odată cu aceste celebre expediții s-a ivit necesitatea clasării și păstrării acestui imens și valoros material științific, în incinte speciale, numite herbare. Numărul acestora, la început mic, a crescut continuu, existînd azi pe glob peste 1200 de herbare. Lucrarea „*Index herbarium*", tipărită la Haga sub egida Biroului Internațional de Nomenclatură și Taxonomie, cuprinde, alfabetic pe orașe, aproape toate herbarele de pe glob cu menționarea adresei colecțiilor pe care le cuprinde, ce schimburi dorește să facă și a indicativului de circulație internațională.

Considerăm interesant de a menționa aici cîteva dintre cele mai mari herbare care cuprind fie colecții unice fie materiale de o deosebită valoare taxonomică; — *Herbarul de la Grădina Botanică Regală din Kew* (Anglia) — cu peste 5.000.000 de exemplare; — *Herbarul de la British Museum* (Anglia) — cu circa 4.000.000 de exemplare. Tot aici se află și herbarul celebrului naturalist suedez *K. Linné*. Avîndu-se în vedere valoarea inestimabilă a acestui herbar el a fost transportat la Londra de o escadrilă de război, iar aici este păstrat în recipiente speciale cu vid; — *Herbarul Grădinii Botanice din Geneva* (Elveția) — cu peste 3.500.000 de exemplare, unde se păstrează, în aceleași condiții ca și herbarul lui K. Linée, *Herbarul lui De Candolle*; — *Herbarul Muzeului de Istorie Naturală din Paris* (Franța); *Herbarul Institutului Botanic din Leningrad al Academiei de Științe a U.R.S.S.*; — *Herbarul Grădinii Botanice din New-York*. Toate aceste herbare cuprind fiecare peste 3.500.000 de plante. Menționăm, de asemenea, — *Herbarul Grădinii Botanice din Bogor* (Indonezia), ce cuprinde o interesantă colecție de plante din Oceania; *Herbarul Universității din Sydnei*, în care sînt inserate numeroase specii vegetale din Australia și Tasmania; — *Herbarul de la Cape Town (S.U.A.)*, cu o colecție importantă de plante suculente din sudul Africii.

Regretabilă este dispariția unuia dintre cele mai importante herbare de pe glob, *Herbarul de la Berlin*, care a ars în timpul celui de al doilea război mondial. Printre cele peste 4.000.000 de plante, colectate de pe toate meridianele și paralelele globului, se aflau și colecții celebre, unice, de o valoare inestimabilă.

În *„Index Herbarium"* — lucrare citată anterior — figurează şi patru din herbarele existente în R. S. România ; *Herbarul Grădinii Botanice din Cluj-Napoca* („Cl"), *Herbarul Institutului Botanic din Bucureşti* („Buc"), *Herbarul Institutului de Biologie din Bucureşti* (Buca") şi *Herbarul Grădinii Botanice din Iaşi („I").*

Dintre colecţiile mai importante existente în herbarele din ţara noastră menţionăm : colecţia lui J. Baumgarten . (1765—1854), cu circa 20.000 de exemplare, herbarul lui Römer (1848—1926), algele europene din colecţia Thümen-Rabenhorst, mixomicetele lui M. Brandză, herbarele lui F. Porcius şi P. Cretzoiu ş.a.

Herbarul Grădinii Botanice din Cluj-Napoca rămîne în continuare cel mai valoros, fiind cel mai mare — cu peste 500.000 de exemplare — şi cel mai complet din ţara noastră. Tot aici, din iniţiativa şi conducerea ilustrului botanist român Al. Borza, s-a editat începînd din anul 1921 *„Flora Romaniae Exsiccata"* în 70 de exemplare, dintre care 34 sînt folosite pentru schimb cu instituţii similare de pe glob. Herbarul Institutului Botanic din Bucureşti are ca nucleu bine individualizat *Herbarul General* care cuprinde colecţii bogate, ce reprezintă un preţios material comparativ pentru documentare.

Herbarul General cuprinde colecţii dintre cele mai valoroase de pe glob şi anume : L. Rabenhorst — *Algae Europaeae*, Thümen — *Mycotheca Universalis ;* V. Schiffner — *Hepaticae Europaeae Exiccatae ;* O. Baenitz — *Herbarium Europaeum ;* P. Saccardo — *Mycotheca Veneta* ş.a. În cuprinsul herbarului se mai găsesc şi rămăşiţele a două valoroase colecţii, herbarul prof. Grecescu şi herbarul lui P. Cretzoiu.

Între diferitele herbare de pe glob s-au stabilit şi statornicit strînse relaţii concretizate prin schimburi reciproce de materiale şi publicaţii. Acest schimb se realizează atît pe plan naţional cît şi pe plan internaţional. Schimbul are ca scop principal diversificarea colecţiilor, completarea celor existente, şi pe cît posibil obţinerea tipurilor. Un alt aspect al relaţiilor dintre herbare este împrumutul de material, în special de tipuri, pentru cercetări taxonomice comparative.

1.1.2. TIPURI DE HERBARE

Se cunosc mai multe tipuri de herbare, clasificate după o serie de criterii :

— *h. taxonomice* — cuprind taxoni vegetali aranjaţi în ordine sistematică ; la rîndul lor ***h.t.* sînt de mai multe feluri** : *h.t. generale* — cuprind colecţii de plante de pe tot globul; *h.t. regionale* — cuprind taxonii vegetali ce cresc pe teritoriul unei ţări sau al unei provincii. La rîndul lor *h.t.g.* şi *h.t.r.* pot fi divizate în funcţie de unităţile taxonomice pe care le cuprind în ; *h. algologice, h. micologice, h. lichenologice, h. briologice* ş.a. Oricare dintre aceste herbare taxonomice are o deosebită valoare ştiinţifică şi didactică ; *h. fitocenologice* — cuprind taxoni vegetali grupaţi în fitocenoze, în funcţie de valoarea cenotică a acestora şi nu taxonomică ; *h. ecologice* — în care plantele sînt grupate în funcţie de biotopii din care au fost colectate ; *h. fenologice* — care

cuprind taxoni vegetali ordonați în funcție de ciclul lor de dezvoltare (ex. perioada de înflorire și fructificare etc.); *h. morfologice* — în care sînt inserate variate specii, ordonate și grupate după criterii morfologice (ex. tipul de aparat vegetativ, tipul de organ vegetativ — rădăcină, tulpină, frunză — sau reproducător — floarea s.a.); *h. cu plante utile omului;* ex. *h.* cu plante alimentare, *h.* cu plante medicinale, *h.* cu plante furajere, *h.* cu plante tehnice, *h.* cu plante melifere sau ornamentale etc.

1.1.3. ALCĂTUIREA HERBARELOR

Tehnica de întocmire a unui herbar didactic sau științific implică o serie de operații succesive și anume: herborizarea (recoltarea plantelor), uscarea prin presare, determinarea (identificarea taxonilor), aranjarea pe coli și conservarea plantelor.

Herborizarea. După o temeinică inițiere teoretică, care presupune o bună cunoaștere a morfoanatomiei, ecologiei, biologiei și taxonomiei plantelor, se poate trece la studiul practic al acestora, care începe cu recoltarea lor, operație cunoscută sub numele de herborizare.

Pentru herborizare sînt necesare o serie de ustensile și materiale dintre care esențiale sînt următoarele (fig. 1—6):

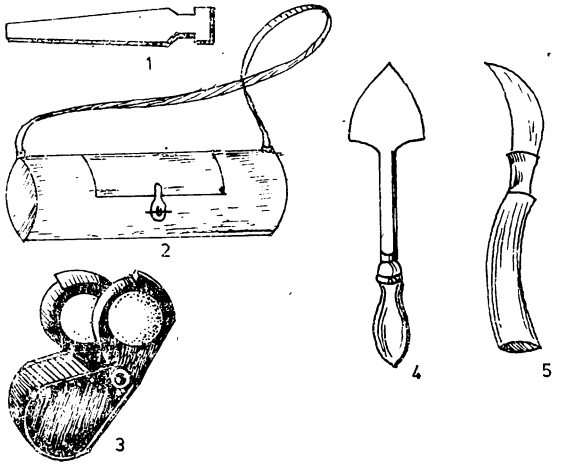


Fig. 1—5 — Ustensile utilizate în recoltarea materialelor biologice: 1 — dalta; 2 — botanieră; 3 — lupa geologică; 4 — deplantor; 5 — cosor.

— *lupa* cu o putere de mărime de 10 x și 20 x — este necesară pentru o primă identificare a plantelor pe teren, facilitînd observarea unor caractere morfologice inaccesibile ochiului uman (fig. 3); — *deplantator* (= lopățică) — cu ajutorul căruia se scot plantele superioare, tericole împreună cu porțiunea lor subterană (fig. 4); — *botanieră* — cutie specială din tablă, de formă oval-cilindrică, în care se depozitează,

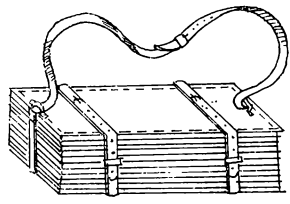


Fig. 6 — Presa de teren.

temporar, plantele recoltate pe teren (fig. 2); în lipsa acesteia se pot utiliza, cu deplin succes, pungi de material plastic; — *presa de teren* — utilă deoarece unele plante trebuie introduse în presă imediat după recoltare. Este formată din două plăci de placaj sau de carton, sau din două plase de sîrmă, rigide, sudate pe rame de alumină de formă dreptunghiulară (30 × 45 cm), ce se pot strînge cu chingi, arcuri metalice sau benzi de cauciuc, între care se prind colile de sugativă (sau foile de ziare), intercalîndu-se și cîteva coli de carton gofrat pentru a asigura o oarecare aerisire (fig. 6); — *hîrtie sugativă specială* — sau în lipsa acesteia *ziare* — necesară la presarea plantelor pe teren; — *cuțit* cu lama lungă și bine ascuțită util la desprinderea algelor, lichenilor și mușchilor de pe substrat (scoarța arborilor, pietre, lemne, pămînt) (fig. 5); — *dalta și ciocanul* — necesare pentru obținerea unor fragmente de stîncă pe care se dezvoltă unele grupe taxonomice de plante inferioare (fig. 1); — *etichete* — pe care se vor nota imediat după recoltare; denumirea plantei (dacă aceasta poate fi identificată pe teren), localitatea, stațiunea, altitudinea, expoziția și data recoltării. Aceleași date vor fi trecute și în *caietul de teren*, la care se mai pot adăuga unele date ecologice și fitocenologice. Uneori se procedează și astfel: fiecare plantă poartă un număr, iar toate datele necesare sînt trecute numai în caiet în dreptul numărului respectiv; — *harta regiunii* — în care se face deplasarea și o *busolă* sînt indispensabile pentru orientarea în teren; — *altimetru* — indispensabil în cazul în care deplasarea se face într-o regiune colinară sau montană, pentru aprecierea corectă a altitudinii stațiunilor.

Cînd herborizarea are drept scop unele cercetări ecologice sau fitocenologice, pe teren vor fi transportate și alte ustensile și aparate pentru măsurarea valorii unor factori ecologici și realizarea unor calcule statistice.

Calitatea materialelor conservate depinde în mare măsură de modul în care s-a făcut recoltarea acestora, de aceea, acestei operații trebuie să-i acordăm o atenție specială.

Avînd la dispoziție toate aceste ustensile și materiale, în teren se poate trece la recoltarea materialului botanic. Deoarece regnul vegetal este foarte heterogen ca nivel de organizare, habitus și habitat, recoltarea variatelor grupe taxonomice și ecologice de plante se face în mod diferit. Ca urmare, vom schița în cele ce urmează tehnica de recoltare a diferitelor grupe de plante, începînd cu cele inferioare.

Bacteriile din sol se recoltează pe lame pe care în prealabil s-a depus un strat subțire dintr-un mediu nutritiv gelozat. Lamele se introduc în sol în poziția ± verticală, unde se lasă cîteva zile. După dezvoltarea populațiilor bacteriene, lamele se fixează, se colorează adecvat, se determină microorganismele și se introduc în plicuri, care se lipesc împreună cu eticheta pe coala de herbar.

Flagelatele și algele microscopice, acvatice se colectează cu ajutorul fileului planctonic, de la diferite adîncimi. După filtrarea apei, sedimentul, bogat în celule algale, se fixează cu soluția *Lugol* pentru 24 de ore, apoi în formol 4% (vezi pag. 148). Suspensia algală poate fi concentrată prin centrifugare la o viteză de circa 2000 de turații pe minut, timp de 2—3 minute, Supernatantul se decantează, iar din sediment se fac preparate microscopice durabile, care se determină, se etichetează și se așează pe coli de herbar în pliculețe speciale.

Un material similar poate fi obținut și prin stoarcerea și spălarea unor macrofite acvatice sau răzuirea unor suporturi (lemne, pietre), submerse. În acest caz dominant este perifitonul.

Algele macroscopice corticole, saxicole și *tericole* se colectează prin răzuirea lor de pe substrat cu ajutorul unui cuțit. Materialul obținut se ambalează în pliculețe.

Algele macroscopice se colectează prin desprinderea talului lor de pe substratul pe care se dezvoltă. Pentru cele bentonice care cresc la adîncimi mai mari, așa cum sînt spre exemplu unele alge brune și roșii marine, sînt necesare scufundări sau dragarea fundului apei. Materialul colectat poate fi imediat etalat pe coli de hîrtie, direct în apă sau este fixat cu o soluție fixatoare adecvată (ex. formol 3—5%) și transportat în laborator. Dintre algele macrofite ce pot fi colectate din lacuri, bălți, rîuri și tinoave menționăm : *Oscillatoria sp., Lyngbia sp.* (Cyanobacterii), *Ulothrix* sp., *Oedogonium* sp., *Spirogyra* sp., *Chladophora* sp., *Draparnaldia* sp., (Chlorophyta), *Chara* sp., *Nitella* sp., *Tolypella* sp. (Charophyta). Biotopul marin ne oferă de asemenea un bogat material algal. De pe plafforma litorală a Mării Negre pot fi colectate numeroase specii de alge verzi, brune și roșii : *Ulothrix* sp., *Chladophora* sp., *Enteromorpha* sp., *Ulva* sp. (Chlorophyta), *Cystoseira barbata* și *C. bosphorica* (Phaeophyta), *Bangia* sp., *Porphyra* sp., *Batrachospermum* sp., *Ceramium* sp., *Dassya* sp., *Polysiphonia* sp., *Laurencia* sp. (Rhodophyta).

Ciupercile — reprezintă cea mai mare și mai heterogenă unitate taxonomică și ecologică de plante inferioare. Ca exo- sau endoparazite pe vegetale sau animale sau ca saprofite pot fi pretutindeni întîlnite. Diversitatea lor morfo-anatomică și biologică implică o varietate de

metode de recoltare. Asupra metodelor de recoltare a celor mai comune și mai importante grupe de ciuperci ne vom opri în cele ce urmează :

— *Ciupercile foliicole* — se recoltează împreună cu organul plantei infestat. Se recomandă ca cel puțin un exemplar complet din planta gazdă să fie recoltat, ce va servi la identificarea corectă a acesteia. Uneori se impune colectarea aceleiași plante în mai multe faze fenologice, pentru a surprinde paraziți în variate stadii ale ciclului lor de dezvoltare, fără de care nu se poate face o determinare exactă. Materialele colectate pot fi temporar depozitate în botaniere sau în pungi de material plastic, dar e cu mult mai bine ca imediat, pe teren, să se aranjeze în presă ; — *Ciupercile corticole și lignicole* se vor colecta împreună cu o porțiune din ramură sau cortexul arborelui. Identificarea gazdei trebuie făcută pe teren. În cazul în care din diverse motive nu putem realiza această operație la fața locului se cere ca din planta gazdă să se ia ramuri cu frunze și muguri, flori și fructe ce vor servi la identificarea ulterioară a acesteia în laborator. Eșantioanele pot fi ambalate în hîrtie, pliculețe sau transportate în botanicre sau pungi de material plastic.

— *Ascomycetele și Basidiomycetele cu corpuri de fructificație cărnoase* se întîlnesc în majoritatea biocenozelor de la șes, deal și regiunea montană, din primăvară pînă în toamnă, mai abundente fiind în perioadele calde și umede ale anului. Pentru colectarea acestora este necesar a se cunoaște cîteva reguli, dintre care esențiale sînt următoarele :

— se vor recolta numai carpoforii sănătoși (neatacați de viermi, gasteropode și insecte) și completi (cu picior, pălărie, volvă, inel, velum, cortină ș.a.) ;

— din aceeași specie se vor recolta mai multe exemplare aflate în diferite etape de dezvoltare (tinere, mature și îmbătrînite) ;

— ciupercile lignicole și corticole vor fi desprinse împreună cu o porțiune din substrat ;

— în măsura în care timpul ne permite este recomandabil a se obține și o sporogramă de la fiecare specie recoltată, foarte utilă și uneori indispensabilă în identificarea lor (fig. 9 E) ;

— pe lîngă datele amintite în cazul ciupercilor cărnoase, în caietul de teren se va nota în plus culoarea himenoforului, pălăriei și piciorului (cînd ambele componente sînt prezente), consistența, culoarea stromei proaspăt ruptă și după un timp oarecare, mirosul și eventual gustul. Aceste date pot fi completate cu unele schițe sau fotografii, toate fiind necesare la determinare.

Macromicetele cărnoase după colectare se curăță bine de pămînt, se ambalează în tuburi de sticlă, borcane, cutii de carton sau de lemn, și se transportă în laborator. În cazul în care ne lipsesc asemenea ambalaje carpoforii pot fi așezați, cu multă grijă, direct în botanieră, cutii de lemn sau coșuri de nuiele. Trebuie acordată o deosebită atenție manipulării și transportului acestui tip de ciuperci deoarece se deteriorează foarte repede ; materialul își pierde astfel din valoarea științifică și didactică, iar uneori nu mai poate fi utilizat în nici unul din aceste scopuri.

— *Mucegaiurile*. Sînt unele grupe de ciuperci care nu pot fi păstrate în colecțiile de herbar, iar altele foarte greu. Printre acestea din

urmă se numără și mucegaiurile. Este posibil obținerea unor eșantioane pentru herbarul micologic folosind următoarea metodă. Mucegaiurile (*Mucor* sp., *Rhyzopus* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., ș.a.) se cultivă în cutii Petri pe un mediu corespunzător. Cînd cultura a atins stadiul de dezvoltare optim, ciuperca se omoară folosind mai adesea, vapori de formalină. Cultura împreună cu substratul nutritiv gelozat se deshidratează. După o ambalare corespunzătoare în celofan și în plicuri de hîrtie, materialul poate fi inserat în herbar.

— *Lichenii* — spre deosebire de alte grupe taxonomice de plante, grație particularităților lor biologice, pot fi recoltați în tot timpul anului ; mai puțin cei tericoli, iarna, cînd sînt acoperiți de zăpadă. Recoltarea se face cu un cuțit prin intermediul căruia lichenii pot fi desprinși de substrat împreună cu o porțiune din acesta. Pentru lichenii saxicoli, crustoși și microfolioși se va utiliza dalta și ciocanul, instrumente cu care se pot obține fragmente din stînca pe care se dezvoltă aceștia. Și în acest caz, la recoltare și transport se impune a fi respectate unele indicații :

— fiecare eșantion lichenic se va desprinde cu o porțiune din substrat ;

— se va acorda o atenție deosebită marginii talului și fructificațiilor, care trebuie să însoțească eșantionul, fiind caractere de determinare ;

— lichenii gelatinoși uscați, fiind foarte fragili, se recomandă ca înainte de ambalare să fie ușor umectați, ceea ce le conferă elasticitatea necesară.

Probele recoltate se ambalează imediat, separat, în piculețe numerotate, confecționate în prealabil în acest scop.

Mușchii (Bryophytele) împreună cu lichenii constituie pionierii vegetației. Ca urmare habitatele lor se suprapun în mare parte, iar tehnica de recoltare este în general similară.

Cormofitele (Pteridophyta, Gymnospermae și *Angiospermae*) — prin numărul mare de indivizi domină vegetația actuală a globului pămîntesc. Marea majoritate sînt aeriene terestre ; puține populează, azi, mediul primar de existență al vegetalelor, apa.

La recoltarea cormofitelor terestre ne servim de deplantator pentru detașarea plantei din substrat împreună cu organele sale suberane (rădăcini și tulpini-rizomi, tuberculi, bulbo-tuberculi sau bulbi). Cele acvatice pot fi smulse cu mîna, iar cînd apa este prea adîncă se scot la suprafață prin dragarea fundului apei.

Regulile ce se impun a fi respectate sînt următoarele :

— se recoltează numai plante sănătoase, complete, cu toate organele vegetative (rădăcină, tulpină, muguri, frunze) și reproducătoare (strobili, sori, sporangiocarpi, conuri, flori — în funcție de taxon). Dacă pentru determinare sînt necesare și fructele, aceeași plantă se va recolta în diferite stadii fenologice (în perioada de înflorire și după maturarea fructelor). Astfel pot fi recoltate numai plantele ierboase cu habitus mic. De la plantele ierboase mari se pot îndepărta acele porțiuni din tulpină care nu prezintă importanță taxonomică ;

— organele tuberizate se vor secționa reținîndu-se numai o parte din acestea, pentru a putea fi mai ușor presate și uscate;

— de la plantele lemnoase (arbori, arbuști, subarbuști și liane) se vor lua doar acele părți care sînt strict necesare pentru determinarea lor (ramuri tinere cu frunze și muguri, flori, fructe, iar uneori și eșantioane din cortexul trunchiului);

— recomandabil este a se recolta mai multe exemplare din aceeași specie, dar nu se vor lua niciodată toate plantele întîlnite, iar în cazul celor rare și ocrotite nu se va culege nici una; prezența plantei va fi notată în carnet și dacă este posibil i se va face o fotografie;

— plantele nu se vor recolta nici pe timp ploios și nici pe arșiță; orele 8—10 și 16—18 sînt cele mai propice;

— plantele diurne se vor recolta în timpul zilei, iar cele nocturne pe seară, pentru ca florile să fie bine desfăcute.

De fiecare plantă recoltată se va atașa cîte o etichetă care va cuprinde datele mai sus menționate sau numai o cifră. Pot fi introduse imediat în presă sau depozitate și transportate în botaniere sau pungi de material plastic.

Presarea și uscarea — Plantele recoltate se presează și se usucă, operații care în linii generale sînt similare la toate grupele de plante. Pentru unele grupe taxonomice și ecologice de vegetale se practică unele tehnici speciale.

Cormofitele terestre, transportate în laborator, vor fi imediat presate și uscate. Unii botaniști recomandă introducerea plantelor în presă după o ușoară ofilire, ceea ce ușurează întinderea lor. Oricum această operație nu trebuie amînată mai mult de 24 de ore deoarece riscăm ca plantele să fie invadate de mucegaiuri, iar florile să-și schimbe culoarea. Fiecare plantă, după ce se curăță bine de pămînt, se așează pe hîrtia de filtru specială sau pe foi de ziar. Frunzele și florile se vor întinde foarte bine; cel puțin una sau două frunze vor fi răsucite cu 180° pentru ca la determinare să se poată analiza cu ușurință ambele fețe foliare. Florile vor fi, de asemenea, cît mai mult posibil desfăcute pentru a facilita analiza detaliată a componentelor sale. Înainte de a fi așezate pe coli, organele tuberizate (rădăcini, rizomi, bulbi și tuberculi) vor fi secționate, de regulă, longitudinal, reținîndu-se numai părțile esențiale ale acestora. Dacă plantele sînt mici, se pot aranja pe aceeași coală, două sau mai multe exemplare din aceeași specie și cu același habitat. Alături de plantă(e) pe fiecare coală se așează și eticheta pe care s-au completat toate datele menționate. Peste fiecare coală („cămașă") pe care s-au aranjat plantele, se pune așa numitul „strat tampon" sau „șaltelute" format din două sau trei coli de sugativă (sau de ziar). Tot așa se procedează pînă la aranjarea tuturor plantelor colectate pe teren.

Pentru unele flori cu petale suculente se recomandă a se așeza sub și peste acestea un strat subțire de vată hidrofilă care asigură o mai rapidă și mai optimă presare a lor.

Multă atenție însă! Plantele trebuie aranjate în așa fel, încît în permanență pachetul ce se formează să aibe o formă perfect paralelipipedică (prismă dreptunghiulară). Cînd pachetul are înălțimea de 40(—50) cm se introduce între plăcile presei și se strînge cu chingi sau arcuri. În lipsa presei se poate utiliza o placă de lemn (35 × 50 cm)

care se așează peste pachetul de plante, iar peste aceasta, greutatea corespunzătoare care să asigure presarea optimă. Plantele vor fi ținute în presă pînă la completa uscare fiindcă altfel se încrețesc (în special florile și frunzele).

În lipsa unei instalații speciale (de tipul celor ilustrate în fig. 7) plantele se usucă în decurs de mai multe zile ; este însă necesar ca „saltelușele tampon" să fie schimbate în fiecare zi. Putem să ne dăm seama dacă plantele sînt complet uscate prin atingere cu mîna ; dacă nu sînt reci înseamnă că uscarea este perfectă și ele pot fi scoase din presă.

Această metodă clasică de uscare este greoaie, durează mult și adesea este imperfectă pentru unele tipuri morfologice de plante. Pentru accelerarea uscării plantelor s-au preconizat : înlocuirea de 2—3 ori pe zi a hîrtiei tampon, folosirea preselor cu plasă de sîrmă, intercalarea cartoanelor gofrate pentru a se asigura o mai bună aerare, utilizarea fierului de călcat ș.a. Toate aceste recomandări sînt însă deficitare.

O uscare rapidă și perfectă a plantelor, cu conservarea fidelă a caracterelor morfologice (dimensiune, culoare etc.) se poate realiza în termostate speciale (sau instalații improvizate) prevăzute cu un sistem de încălzire și ventilație (fig. 7). Temperatura de 40—50 grade asigură o rapidă evaporare a apei, iar sistemul de ventilație permite evacuarea vaporilor formați.

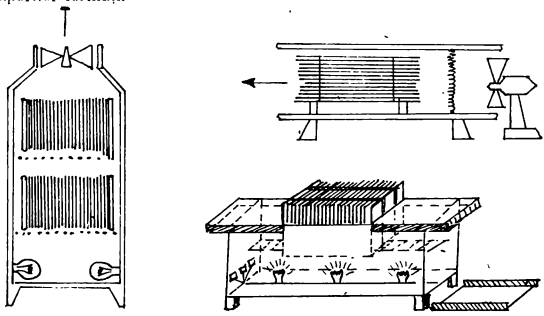


Fig. 7 — Instalații pentru uscarea plantelor din presă.

Algele macroscopice și plantele acvatice se etalează pe coli albe sau foi de celofan, procedînd astfel : într-o tavă metalică cu dimensiuni de circa 50 × 60 cm (fig. 8) umplută cam pe trei sferturi cu apă, se pun pe rînd plantele colectate (alge sau cormofite). Cu ajutorul unei pensule mici și moi și a unor ace și pense fine se îndepărtează impurităților și se răsfiră cît mai mult posibil elementele componente ale plantei. Pe o bucată dreptunghiulară de geam (20 × 30 cm) umectată se așează o bucată de hîrtie lucioasă sau o foaie de celofan cam de

aceeași dimensiune. Geamul (eventual placa de lemn) împreună cu coala de hîrtie se introduc încet sub planta din tavă, după care se scoate afară. Pe hîrtie rămîne prinsă planta. Dacă etalarea nu este corespunzătoare, prin pipetarea apei și cu ajutorul aceloraşi instrumente se pot

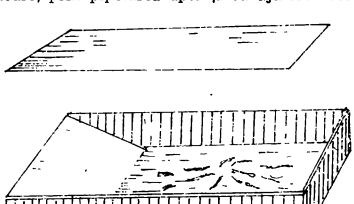


Fig. 8 — Tavă pentru etalarea plantelor acvatice.

face ultimele retușuri. Coala, de care rămîne prinsă planta, se detașează de pe dreptunghiul de sticlă și se așează pe un plan înclinat din lemn sau sticlă acoperit cu hîrtie sugativă și o bucată de pînză albă, pentru scurgerea și absorbția excesului de apă. Operația durează numai cîteva minute (5—10'); timpul nu trebuie prelungit deoarece are loc o deshidratare parțială a plantei și ca urmare încrețirea acesteia. Coala de care rămîne prinsă planta se introduce în presă; dar, spre deosebire de plantele aeriene terestre, de astă dată deasupra fiecărei plante se așează o bucată de pînză albă apoi „salteluța" absorbantă, pentru a evita lipirea plantelor pe hîrtia de filtru. Deci, succesiunea straturilor într-o astfel de presă este următoarea: strat tampon (saleluța absorbantă); coala lucioasă cu planta acvatică; bucata de pînză albă; strat tampon-absorbant.

Deoarece plantele acvatice conțin un procent ridicat de apă, hîrtia de filtru care formează „salteluța absorbantă" ca și bucata de pînză se vor schimba prima dată după circa 30', a doua oară după 2—3 ore, iar în continuare, pînă la completa uscare, după 24 de ore. Pe măsură ce plantele se usucă aderă foarte puternic de hîrtia lucioasă pe care au fost etalate, așa încît nu mai pot fi desprinse.

Ciupercile foliicole se presează și se usucă întocmai ca plantele superioare, care de fapt reprezintă gazda acestora.

Ciupercile cărnoase, de regulă, nu se introduc în herbare; ele se usucă și se conservă prin metode speciale, descrise mai departe și se păstrează în colecții. Totuși se pot obține și exemplare ce pot fi intercalate în herbare, dar acestea au numai o valoare didactică nu și științifică, deoarece prin presare o serie de caractere taxonomice sînt profund alterate. Astfel de exemplare se obțin prin secționarea centrallongitudinală a carpoforilor cu ajutorul unei lame de ras. Din fiecare jumătate se face cîte o secțiune longitudinală de circa 2—3 mm grosime, care apoi se pot presa. Secțiunile trebuie cuprinse mai înainte de presare între două coli de hîrtie poroasă pentru a evita aderarea acestora de colile presei. Materialul rămas se curăță cu ajutorul unei linguriță,

de țesutul stromatic, și se aranjează în presă. De la alte exemplare ale aceleiași specii se vor izola straturile externe ale carpoforului, prin îndepărtarea cu multă atenție a țesutului stromatic și se vor presa ca mai sus (fig. 9).

Determinarea ciupercilor superioare (Basidiomycetelor) adesea nu poate fi făcută fără analiza detaliată, a sporilor. Întrucît aceștia nu mai pot fi obținuți de la exemplarele conservate, este necesară colectarea lor mai înainte. În acest scop se obțin așa numitele sporograme. *Sporograma* reprezintă figura circular-radiară pe care o formează sporii căzuți de pe stratul himenial al carpoforului pe o foaie de hîrtie, de celofan sau o bucată de sticlă (fig. 9).

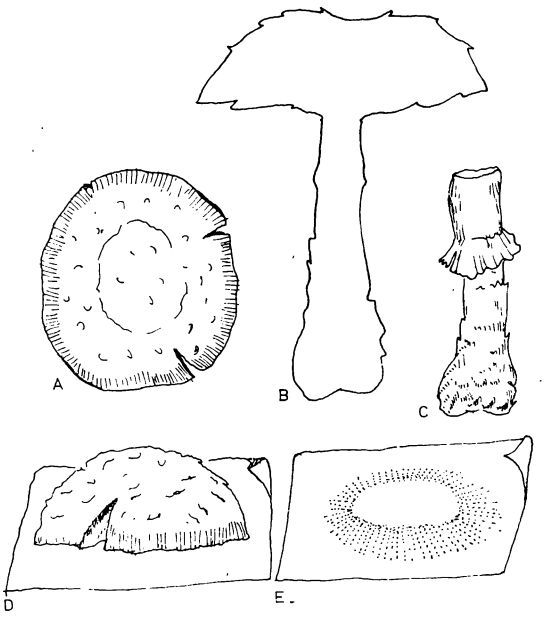


Fig. 9 — Planșă de herbar cu macromicete (Basidiomicetes): A — pălăria bazidiocarpului presată; B — secțiune longitudinală prin zona mediană a bazidiocarpului; C — piciorul bazidiocarpului presat; D — pălăria bazidiocarpului; E — sporograma;

-O sporogramă se poate obține astfel : se desprinde piciorul de pălărie. Pălăria se așează cu himenoforul în jos pe o bucată de hîrtie (albă sau neagră, în funcție de culoarea sporilor), de celofan sau de sticlă, și totul se acoperă cu un clopot de sticlă pentru a menține o anumită umiditate. În această poziție se lasă circa 24 ore, timp în care sporii se desprind de pe stratul himenial și se depun pe hîrtie (celofan, sticlă), rezultînd sporograma. Sporii se vor fixa în această poziție prin pulverizarea deasupra lor a unei soluții de colofoniu 1—2% în alcool 95% sau a unei soluții formată din colofoniu (o parte) și terebentină (patru părți).

Sporograma, bine ambalată în pliculețe, se va lipi pe aceeași coală de herbar cu ciuperca căreia îi aparține. Imediat, sau mai tîrziu se vor întocmi și preparate cu spori, ce vor servi la identificarea taxonului.

Lichenii crustoși și microfoliari nu necesită a fi presați ; cei macrofiloși, fructuloși și gelatinoși ca și mușchii colectați pe timp secetos vor fi ușor umectați înainte de a fi presați.

Din cele expuse pînă aici rezultă că presarea și uscarea plantelor reprezintă o etapă deosebit de importantă de care depinde în cea mai mare măsură calitatea materialului de herbar. De aceea considerăm necesar a menționa regulile ce se impun a fi respectate pentru o deplină reușită a acestei operații ;

— este necesar ca plantele herborizate să fie presate și uscate în cel mai scurt timp posibil ;

— uscarea să se facă cît mai rapid pentru conservarea fidelă a caracterelor morfologice ; pentru aceasta colile utilizate în acest scop trebuie să fie bine uscate și schimbate cît mai des. Utilizarea instalațiilor speciale sau improvizate facilitează cu mult reușita uscării ;

— plantele să nu depășească dimensiunile hîrtiei folosite pentru uscare și presare. Dacă plantele sînt mai mari se pot îndoi sau fragmenta (fig. 10) ;

— toate organele plantelor să fie cît mai bine etalate și răsfirate ;

— organele tuberizate ale plantelor se secționează longitudinal ;

— plantele cu ghimpi și cele suculente se vor presa separat ; ultimele e bine să fie cufundate în prealabil în alcool 70%, formol, sau să se toarne peste ele apă clocotită în care se țin 10—15' ;

— florilor, organele cele mai importante pentru taxonomie, le vom acorda întotdeauna cea mai mare atenție ; după o perfectă etalare se va pune un strat de vată hidrofilă atît dedesubt cît și deasupra acestora pentru o deshidratare rapidă și o presare perfectă ;

— orhideele și alte plante care se înegresc foarte repede prin presare, se recomandă a fi tratate, înainte de introducerea lor în presă, cu soluția lui *Hechler* formată din :

— acid salicilic . . . . . 1 parte
— alcool etilic absolut . . . . . 10 părți
— soluție concentrată de SO_2 . . . . 20 părți

— plantele lipicioase (cleioase) se vor presa separat între coli de hîrtie cerată ;

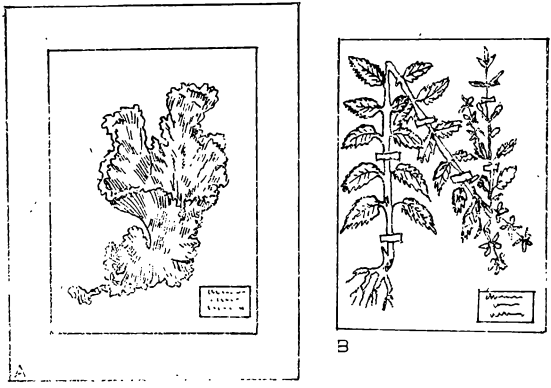


Fig. 10. Planșe de herbar : A — cu macrofite acvatice : B — cu o cormofită ierboasă, terestră.

— după uscare, frunzele coniferelor cad foarte repede ; pentru a evita acest impediment ramurile cu frunze se vor cufunda în apă clocotită pentru 2—3 minute, sau într-o soluție formată din :

— soluție apoasă, subțire, de clei de tîmplărie 1000 ml
— apă distilată . . . . . 1000 ml
— alcool etilic absolut . . . . . 1000 ml

La lariță *(Larix decidua)* se depun cu pipeta una, două picături de clei de tîmplărie, în mănunchiul de frunze de pe brachiblaste.

Determinarea. Identificarea taxonilor este o operație deosebit de importantă, dar dificilă, care solicită din partea celui ce o face multă răbdare, pasiune și meticulozitate. O determinare corectă, mai adesea, nu poate fi făcută decît de specialiști ai grupului respectiv. Pentru determinarea taxonilor se utilizează : determinatoarele pentru grupul respectiv, albumele, atlasele și herbarele.

În ori care dintre determinatoare sînt incluse cheile dichotomice, diagnozele, desenele și fotografiile habitusului taxonilor sau a unor caractere morfologice și anatomice esențiale. Comparînd caracterele morfoanatomice și uneori chimice ale plantei cu cele incluse în chei, diagnoze, desene și fotografii se poate ajunge în final la cunoașterea taxonului căreia îi aparține individul. Pentru a avea convingerea că determinarea a fost corectă, se va compara individul vegetal cu cel existent la diferite exicate.

Întrucît prin uscare și presare multe caractere morfoanatomice și chimice se alterează, cel puțin pentru unele grupe de plante, determinarea este bine a se face înaintea acestor etape. Dacă timpul nu ne permite este necesar ca în carnetul de teren să fie notate cît mai multe date, iar unele plante sau părți ale acestora (ex. : flori, fructe, spori ș.a.) să fie conservate în lichide adecvate care le asigură o conservare mai fidelă și pot fi mai ușor analizate.

1.1.4. MONTAREA PLANTELOR PE COLILE DE HERBAR

După uscare, presare și determinare, plantele vor fi aranjate (montate) pe colile de herbar. Colile de herbar sînt cartoane duplex, albe cu dimensiuni de 25 × 35 cm sau mai bine de 30 × 42 cm. Plantele se fixează pe aceste cartoane prin fîșii înguste de hîrtie gumată, de circa 2—3 mm lățime. Lipirea plantelor direct prin suprafața lor inferioară este un procedeu neștiințific, care scade mult din valoarea unui herbar. În colțul din dreapta — jos al colii se lasă suficient loc pentru lipirea etichetelor pe care se vor nota ; titlul colecției, denumirea științifică (genul și specia) și populară, localitatea, stațiunea, altitudinea și numele celui care a recoltat și determinat planta (fig. 10 b). Eticheta are valoare de document reprezentînd rezumatul biografic al individului vegetal respectiv.

Pe fiecare carton se va lipi o singură plantă, dacă aceasta este mare, sau mai multe, în cazul celor mici, dar care trebuie să aparțină aceleiași specii sau aceluiași taxon infraspecific. Dacă este necesar și posibil, se vor lipi pe același planșă mai mulți indivizi aflați în diferite faze fenologice.

Este recomandabil ca unele flori să fie desmembrate și astfel lipite pe coală.

Unele plante vor fi însoțite și de piculețe cu fructe și semințe, dacă acestea sînt indispensabile la identificarea taxonului.

Macrofitele acvatice se vor lipi pe planșă împreună cu coala de hîrtie sau celofan pe care au fost etalate și de care au rămas prinse prin presare și uscare (fig. 10 A).

Unele plante inferioare (alge, ciuperci, licheni, mușchi) vor fi ambalate în piculețe speciale, confecționate din coli albe de hîrtie, iar acestea la rîndul lor vor fi lipite pe coala de herbar. (Modul de confecționare și aranjare a piculețelor pe colile de herbar sînt prezentate schematic în fig. 11 și 12). În funcție de mărimea piculețelor pe aceeași coală pot fi lipite 2, 3 sau chiar 4 piculețe, avînd însă grijă ca plicurile de pe o coală să alterneze cu cele de pe coala anterioară și următoare.

După lipirea tuturor plantelor, colile se ordonează și se grupează în funcție de scopul urmărit și se înseră în herbar. În herbarele științifice plantele sînt ordonate după criterii taxonomice pe filumuri, clase, ordine, familii, genuri și specii. Spermatofitele sînt clasificate, în majoritatea herbarelor de pe glob, după sistemul din „Genera Siphonogamarum" a lui Dalla Torre și Harmus H. (1900).

Un herbar de licheni și mușchi poate fi realizat și în alt mod : plicurile cu material nu se lipesc pe coli ci sînt aranjate, tot în ordine sistematică, în cutii de carton de dimensiuni apropiate cu cele ale pli-

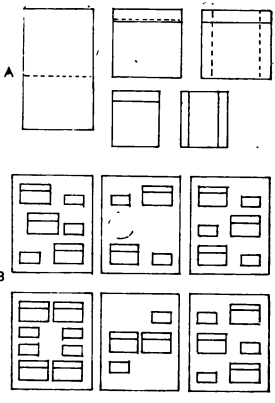


Fig. 11 — A confecționarea pliculețelor pentru herbar ; B — aranjarea pliculețelor cu material biologic presat pe colile de herbar.

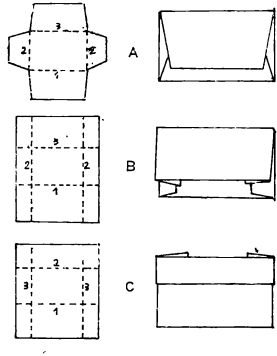


Fig. 12 — Confecționarea pliculețelor pentru herbar.

cului. În acest caz eticheta se lipește pe plic. Pentru mai multă siguranță eticheta se scrie în dublu exemplar ; una se lipește pe plic, iar cealaltă se introduce în interiorul acestuia (fig. 13 B).

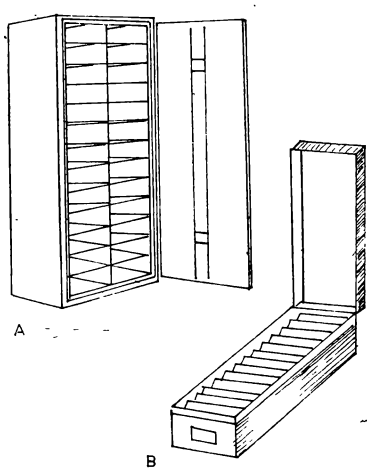


Fig. 13 — A — dulap pentru herbar; B — cutie pentru colecțiile de criptogame.

1.1.5. CONSERVAREA HERBARELOR

Herbarele prezintă din punct de vedere științific o valoare inestimabilă. Progresul unor științe biologice ca: taxonomia, fitocenologia, morfologia plantelor ș.a. ar fi fost foarte lent în lipsa acestora. De aceea, colecțiile de herbar, odată alcătuite, trebuie conservate (întreținute) cu multă grijă.

Colecțiile de plante se păstrează în clădiri sau încăperi speciale numite herbare. Herbarele sînt dotate cu dulapuri metalice sau de lemn (primele sînt preferate), prevăzute cu rafturi și uși, care se închid ermetic, în care se depozitează plantele. Dimensiunile unui astfel de dulap sînt în general următoarele 210 × 75 × 50 cm (fig. 13 A).

Încăperile nu trebuie să aibe igrasie, să fie ferite de eventuale inundații, să posede o bună aerație (ventilație) și o temperatură cît mai constantă (+ 15 — + 18°C).

Plantele vor fi ferite de praf, umezeală, lumină și în special de dăunătorii animali și vegetali. Protecția exicatelor este asigurată prin măsuri profilactice și de combatere a dăunătorilor;

— nu se introduc niciodată într-o colecție plante noi înainte de a fi dezinfectate;

— periodic, plantele din herbare se dezinfectează folosindu-se agenți fizici și în special chimici. Cele mai uzitate metode sînt cele chimice care constau din :

— stropirea sau cufundarea plantei într-o soluție de sublimat 3—5%, metodă eficace și cu efect de lungă durată ;

— desinsecția cu sulfură de carbon. Într-o capsulă, plasată în apropierea pachetului de plante, se pune o anumită cantitate de sulfură de carbon. După circa 3 zile, timp în care a avut loc evaporarea și infiltrarea printre colile de herbar a vaporilor de sulfură de carbon, pachetul de plante se poate aranja la locul său în dulap. Gazarea e bine să se facă în cutii de metal ermetic închise de tipul celei din fig. 14. Metoda este foarte bună dar periculoasă deoarece sulfura de

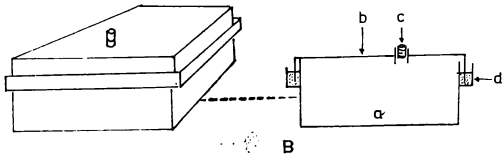


Fig. 14 — Cutie pentru gazarea colilor de herbar : A — aspect general ; B — în secțiune : a — cutia propriu-zisă ; b — capacul ; c — ventil de aerisire ; d — șanț plin cu apă.

carbon este nu numai toxică dar și explozivă. Ca urmare fumegarea trebuie făcută respectîndu-se normele de protecție ;

— petrolarea este o metodă foarte bună (eficientă și puțin costisitoare) ce constă în ungerea, fie a plantei în întregime, fie numai a marginilor colii de herbar, cu petrol lampant ;

— analcidarea este cea mai uzitată metodă actuală, eficientă și de lungă durată datorită cristalelor care rămîn pe plante. Pentru aceasta, pachetul de plante se așează în cutii de tablă speciale prevăzute cu duze pe unul din pereții laterali, prin care se pompează analcidul ;

— mucegaiurile pot fi combătute prin ungerea plantelor cu alcool 80% sau 100% ;

— prăfuirea cu D.T.T. poate suplini cu succes una din metodele mai sus amintite ;

— mai rar se utilizează combaterea termică, ce constă în ținerea plantelor în termostat la 60—70°C, timp de 3—4 ore.

Pe lîngă colecțiile de plante, herbarele mai adăpostesc și fișierele și cataloagele în care sînt trecute, în ordine taxonomică și alfabetică colecțiile pe care le posedă și taxonii existenți în fiecare colecție.

Întreținerea, completarea și îmbogățirea colecțiilor dintr-un herbar sînt asigurate de un colectiv de biologi, tehnicieni și laboranți specializați în acest sens.

1.2. EXPONATE MUZEISTICE

Exponatele de muzeu reprezintă o colecție de plante conservate cu o deosebită valoare în special didactică, dar și științifică. Colecțiile de acest gen prezintă avantajul de a putea fi analizate permanent cu un minimum de efort și cu maximă eficiență.

Prepararea exponatelor se poate face prin uscare, injectare sau imersionare în lichide conservante.

1.2.1. PREPARATE ANATOMICE USCATE

Majoritatea grupelor taxonomice de macrofite pot fi preparate prin uscare. Uscarea se poate realiza prin presare, în nisip sau deshidratare lentă și liberă la temperatura laboratorului sau în etuva termostat.

1.2.1.1. Uscarea prin presare

Preparate anatomice uscate prin presare se obțin în același mod ca și plantele ce sînt inserate în herbare. Exemplarele cele mai reușite și mai expresive vor fi montate pe coli de carton gros, între două bucăți de sticlă sau incluse în rășini sintetice. Esantioanele lipite pe cartoane se recomandă a fi acoperite cu foi de celofan, asigurîndu-le mai multă securitate pe timpul manipulării, fiind totodată ferite de prăfuire.

1.2.1.2. Deshidratarea liberă

Unele plante cu un procent ridicat de material uscat pot fi preparate prin deshidratare „liberă" la temperatura laboratorului sau în termostat (45—60 °C). Așa sînt unele ciuperci lignicole și corticole, majoritatea lichenilor ca și unele briofite. Materialele herborizate se așează pe „saltelute" de hîrtie sugativă, într-un loc ferit de praf sau mai bine în etuva termostat. Macromicetele se recomandă a fi expuse la soare sau introduse în termostat la 34—40°C, suspendate pe plase de sîrmă speciale. Uscarea carpoforilor poate fi grăbită printr-o deshidratare parțială a acestora în alcool 95%, iar culoarea poate fi conservată printr-un tratament chimic preliminar cu o serie de soluții dintre care mai eficace s-a dovedit a fi cea a lui Magnițki, cu următoarea compoziție :

acid boric	5 g
sulfat de zinc 5%	10 ml
formalină 10%	200 ml
zahăr	30 g
apă distilată	10 ml

În acest amestec fixator materialul se ține cîteva ore (2—4 ore, în funcție de mărimea carpoforului), după care se usucă la întuneric și se montează în poziția dorită sub un clopot de sticlă în atmosferă de CO_2.

În general după cîteva zile ciupercile sînt complet uscate și pot fi montate pe cartoane, în cutii speciale de carton cu geam sau în borcane anatomice (fig. 16). Dimensiunea cutiilor va fi aleasă în funcție de mărimea exponatului. Borcanele anatomice sînt preferate cutiilor de carton deoarece pot fi sterilizate asigurînd o mai bună păstrare a materialului.

Aceste exponate sînt mai valoroase decît primele deoarece plantele își păstrează nealterate nu numai caracterele morfologice ci și aspectul pe care-l au în cadrul habitatului.

1.2.1.3. Uscarea plantelor în nisip

Este una din metodele care asigură o conservare aproape perfectă a materialului botanic deoarece acesta suferă cele mai mici deformații. Materiale necesare : nisip, o lădiță din tablă (sau în lipsa acesteia, cutii de lemn sau carton), cornete din carton subțire, sîrmă și, bineînțeles material biologic corespunzător.

Nisipul ideal e cel de cuarț, fiind curat și foarte fin. În lipsa acestuia se poate utiliza cu bune rezultate și nisipul de rîu, foarte bine spălat (într-o găleată cu apă care se schimbă pînă cînd apa rămîne perfect limpede) și calcinat (în cutii de tablă sau de alamă). Calcinarea are drept scop îndepărtarea tuturor resturilor organice. După fiecare utilizare, nisipul fie că e de cuarț sau de rîu — trebuie spălat și calcinat.

În nisip se usucă, de regulă, unele macromicete și florile angiospermelor, procedîndu-se astfel (fig. 15) : pe fundul lădiței de tablă se toarnă

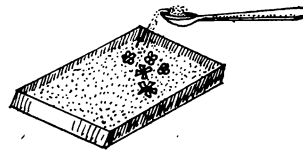


Fig. 15 — Uscarea plantelor în nisip

un strat de nisip cald în grosime de circa 5 cm. Pe suprafața stratului de nisip se aranjează materialul biologic astfel : ciupercile încadrate în familiile *Pezizaceae, Helvelaceae, Clavariaceae* și *Lycoperdaceae* ca și florile Angiospermelor se vor orienta în poziția lor naturală ; *Basidiomycetele* încadrate în familiile *Hydnaceae, Boletaceae, Agaricaceae,* la care carpoforul este format din picior și pălărie, vor fi aranjate în poziție inversă față de cea din natură, adică cu pălăria în jos și piciorul în sus. După acoperirea întregii suprafețe, se toarnă, cu foarte multă atenție, nisip încălzit peste material. Nisipul poate fi turnat cu mîna, cu lingura sau mai bine cu ajutorul unui cornet din carton care lasă să curgă prin vîrful său un jet subțire de nisip. În primul rînd se va umple cu nisip cupa ascofructului sau cupa florii gamopetale, dacă vom usca astfel de materiale, și apoi se vor completa și golurile. Se va continua turnarea nisipului pînă cînd stratul de nisip depășește cu 2—3 cm partea superioară a materialului.

În special pentru flori, recomandate sînt cornetele de carton. La umplerea cornetului cu nisip se vor respecta aceleași reguli. O atenție majoră trebuie să acordăm petalelor și sepalelor, care sub greutatea nisipului se pot îndoi sau își pot schimba poziția normală. Florilor li se poate asigura o mai mare rezistență introducînd în peduncului lor o

sîrmuliță oțeloasă, care va facilita și montarea lor ulterioară în poziția dorită.

Lădița sau cornetele se introduc în termostat la temperatura de 35—40°C sau se așează pe calorifer sau lîngă o sursă de căldură pentru a accelera uscarea. Uscarea are loc în decurs de mai multe zile, în funcție de grosimea și consistența materialului. Cînd uscarea materialului este perfectă se scoate cu maximă atenție nisipul, niciodată prin răsturnare, deoarece riscăm să deteriorăm materialul, ci cu o linguriță. În cazul cornetelor se poate perfora cartonul la mai multe nivele și prin orificiile făcute nisipul se scurge încet.

Pe plantele uscate, de regulă rămîne prins mult nisip care va fi îndepărtat cu ajutorul unei pensule.

Preparatele uscate se montează în borcane anatomice, sau cutii de carton cu geam : cele mai consistente, cum sînt spre exemplu ciupercile, se pot monta pe postamente de lemn a căror dimensiune va fi aleasă în funcție de mărimea exponatului. Ciupercilor li se poate mări rezistența prin lăcuire, dar prin aceasta se alterează întrucîtva unele caractere morfologice (culoarea, luciul ș.a.).

Eșantioanele astfel preparate și montate se expun în vitrinele muzeale sau în dulapuri, ferindu-le de umezeală, iar pe cele viu colorate, de lumină, care, în scurt timp, le decolorează. Din timp în timp și acestc preparate trebuie desinfectate utilizînd una din metodele prezentate în cadrul herbarelor.

1.2.2. PREPARATE ANATOMICE INJECTATE

Prin injectare se prepară în special macromicetele cu carpofori cărnoși. Carpoforii recoltați se curăță și se pun la uscat pe site sau hîrtie de filtru, într-un loc cald și întunecos. După circa 48 de ore se injectează abundent piciorul și pălăria cu o soluție siropoasă de silicat de sodiu sau silicat de potasiu. Cu aceeași soluție se unge cu o pensulă întreaga suprafață a carpoforului, o atenție deosebită acordîndu-se stratului himenial. Ciupercile sînt apoi uscate în decurs de mai multe zile în termostat la temperatura de 35—40°C. Cristalele de silicat de sodiu ce se formează pe carpofor vor fi îndepărtate prin ștergerea acestora cu o cîrpă moale înmuiată în ulei. Montarea se poate face pe postamente în cutii cu geam sau borcane anatomice. Lăcuirea dă un aspect mai frumos exponatelor.

1.2.3. PREPARATE ANATOMICE CONSERVATE ÎN LICHIDE

Rezultate mult mai bune se obțin prin conservarea materialelor pe cale umedă, urmînd metodologia indicată mai jos. Este o metodă cvasiuniversală, practicabilă la majoritatea grupelor taxonomice de plante.

Pentru realizarea unui astfel de exponat sînt necesare următoarele materiale : borcane anatomice de diferite dimensiuni, plăci dreptunghiulare de sticlă, soluții conservante adecvate, lut sau parafină, ață, ace și etichete.

Ordinea operațiilor ce se efectuează în vederea întocmirii unui preparat anatomic în lichide conservante sînt următoarele : colectarea materialului, curățirea (spălarea în apă), fixarea culorii, spălarea în apă,

ordonarea pieselor biologice în borcane sau fixarea acestora pe păci de sticlă, imersionarea în lichidul conservant, acoperirea și etichetarea borcanului. În cele ce urmează vom face o succintă prezentare a tuturor etapelor implicate de tehnica de lucru.

Materialele botanice (plante întregi sau părți ale acestora), imediat după colectare, se vor spăla foarte bine mai întîi în apă curentă și apoi în apă distilată pînă la îndepărtarea tuturor impurităților. Pentru conservarea culorii, materialele biologice sînt cufundate într-o soluție apoasă de 5% sulfat de cupru, în care se lasă timp de 10—48 ore în funcție de dimensiunea și consistența acestora.

Acidul acetic (10—15%, pentru ciuperci și 1—5% pentru flori) ca și amestecurile de mai jos (a→d) pot fi utilizate pentru conservarea culorii plantelor.

a) formol 3% . . . . . 100 cm³, sulfat de cupru-soluție apoasă saturată 10 cm³, b) acetat de cupru 4%. . . . . 1 parte, formol 40% 1 parte, apă distilată 3 părți ; c) lactofenol 5 g, acetat de cupru 0,2 g, apă distilată 95 cm³, d) acid acetic 15% ; sulfat de magneziu 1%, formol 2%, glicerină în apă distilată 2%.

După o nouă spălare în apă curentă și distilată, timp de cîteva ore, pentru eliminarea substanțelor fixatoare din țesuturile vegetale, materialele botanice se aranjează în borcane anatomice.

Ciupercile, precum și unele plante superioare sau organe vegetale cu țesuturi mecanice și lemnoase bine dezvoltate, pot fi montate în poziție verticală, pe rondele de lemn. Piesele astfel montate se vor introduce în borcane. Diametrul rondelelor trebuie să coincidă cu cel al borcanului în care vor fi introduse ; dacă sînt mai mici riscăm să se ridice (să plutească) în momentul turnării lichidului conservant.

Plantele și organele noi se vor fixa prin legare cu ață pe bucăți dreptunghiulare de geam (fig. 16).

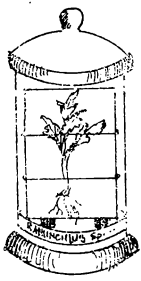


Fig. 16 — Preparat anatomic în lichid conservant.

Alte materiale biologice, cum sînt spre exemplu rădăcinile și tulpinile tuberizate, unele fructe ș.a. pot fi aranjate în borcane fără a mai fi montate pe postamente sau sticlă.

Borcanele în care au fost introduse esantioanele biologice se umplu apoi cu una din următoarele soluții fixatoare :

— *Formol 4% (formalină)* — soluție ce se prepară prin amestecarea unei părți de formol 40% cu 10 părți apă distilată. Este cel mai utilizat conservant fiind puțin costisitor și ușor de procurat. Recomandat în special pentru conservarea pieselor anatomice de colecție și mai puțin a materialelor ce urmează a fi secționate deoarece este toxic și pentru om. În cazul în care materialul a fost totuși conservat în formol, înainte de prelucrare (secționare) se va spăla în apă curentă timp de 30—60' pentru îndepărtarea oricărei urme de formol. Este preferat alcoolului în cazul în care dorim să conservăm culoarea verde a frunzelor sau pigmentația vie a fructelor, semințelor sau a ciupercilor cu pălărie ; pentru aceasta este necesar ca la fiecare 100 ml de formol 4% să se adauge o linguriță de carbonat de sodiu sau sulfat de cupru. Formolul are proprietatea de a întări organele moi și de aceea el este indicat a fi folosit numai pentru acestea.

— *Alcoolul etilic* 70—80% este un excelent conservant în care materialul poate fi păstrat la infinit. Foarte recomandat pentru organele moi cărora le conferă o anumită rigiditate, dar este contraindicat pentru organele tari și friabile ca și pentru cele verzi, deoarece alcoolul dizolvă clorofila. Alcoolul se va schimba de câteva ori, deoarece pe măsură ce organele vegetative se deshidratează el se diluează.

— *Lichidul glicerinat* — se prepară prin amestecarea în proporții egale a substanțelor : alcool etilic 95% — 1/3, glicerină pură 1/3, apă distilată 1/3.

A fost preconizat și recomandat de **Baranov** pentru organele tari, rigide și friabile, deoarece glicerina ce intră în compoziția amestecului are proprietatea de a înmuia țesuturile tari conferindu-le o oarecare elasticitate.

În afara acestor trei soluții mai pot fi utilizate, în special pentru păstrarea pieselor anatomice, următoarele amestecuri conservante :

Ainsworth — cu următoarea compoziție :

formol 40%	25 ml
alcool 95—96%	150 ml
apă distilată	1000 ml

Hessler — foarte indicat pentru conservarea fructelor și a altor organe colorate. Compoziție :

— clorură de zinc	50 g
— formol 40%	25 ml
— glicerină	24 g
— apă distilată	1000 ml

Se prepară prin dizolvarea clorurei de zinc în apă încălzită după care se adaugă celelalte componente.

Drummond-Goncalves — soluție conservantă recomandată îndeosebi pentru fructele cărnoase :

acid sulfuros 5—6%	15 ml
apă distilată	1000 ml

Keef — amestec complex care realizează nu numai conservarea materialului ci și fixarea culorii acestuia. Compoziție :

alcool 96%	70 ml
formaldehidă 40%	5 ml
glicerină	2,5 ml
acid acetic glacial	2,5 ml
azotat de uraniu	1,5 g
clorură de cupru	10 g

Hemaff-Grec — Plantele se imersionează în soluția A. (fixatoare) unde se țin circa 3—4 zile, după care se transferă în soluția B, care se înlocuiește pînă cînd dispare culoarea verde-albăstruie.

A.	glicerină	100 ml
	acid lactic	50 ml
	fenol	50 ml
	acetat de cupru	20 ml
	clorură cuprică	20 g
	Apă distilată pînă la	1000 ml
B.	glicerină	50 ml
	acid lactic	25 ml
	formaldehidă	25 ml
	apă distilată pînă la	1000 ml

Soluție alcool acetică — formată din :

alcool 70%	18 părți
formol 40%	2 părți
acid acetic glacial	1 parte

Pentru păstrarea macromicetelor colorate, rezultate bune dau și următoarele amestecuri :

a)	acetat de mercur	10 g
	acid acetic glacial	5 ml
	apă distilată	1000 ml
b)	alcool 90%	125 ml
	acetat de plumb crist	1 g
	apă distilată	100 ml

Indiferent de conservantul utilizat, pentru mai multă siguranță, borcanele cu material se parafinează pe margine, evitîndu-se în acest fel evaporarea fixatorului. În locul parafinei se poate folosi un lut obținut din :

— gutapercă	200 g
— ceară de albine	50 g
— rășină de brad	50 g

Cele trei substanțe se topesc la un loc (într-un vas de porțelan) la flacără mică, amestecîndu-le continuu ca să nu se lipească. După omogenizare se lasă să se răcească și se poate utiliza. Borcanele astfel pregătite se etichetează și se aranjează în dulapuri cu rafturi dedicate colecțiilor de materiale botanice.

2. MEDII DE MONTARE A PREPARATELOR MICROSCOPICE

Secțiunile colorate, pentru a putea fi analizate la microscop și păstrate în colecția de preparate trebuie montate într-un mediu conservant. În prealabil însă secțiunile vor fi triate, reținîndu-se numai cele mai reușite, corespunzătoare scopului pentru care au fost executate.

Substanța în care se face montarea secțiunilor pe lamă nu poate fi întîmplătoare ; ea trebuie să fie adecvată colorantului utilizat și să reziste timpului. Oricare dintre substanțele utilizate trebuie să îndeplinească o serie de condiții, dintre care esențiale sînt : să nu decoloreze preparatul, să nu modifice aspectul morfo-anatomic al acestuia, să posede un indice cît mai mic de volatilitate pentru a conserva un timp cît mai îndelungat preparatele.

1. *Glicerina-apoasă* se folosește pentru montarea rapidă a secțiunilor direct din apă. Se prepară una din proporțiile următoare :

glicerină pură . . . . 3 părți (două sau chiar o parte)
apă distilată . . . . . 1 parte

În lipsa glicerinei pure se poate recurge și la cea tehnică, dar aceasta din urmă,fiind gălbuie, prezintă dezavantajul de a nu fi tot atît de transparentă.

În momentul montării preparatelor se pune pe o lamă o picătură sau două din acest amestec în care se depun secțiunile (scurse în prealabil pe hîrtia de filtru), peste care se aplică apoi lamela cu multă atenție pentru a se evita formarea bulelor de aer. Cantitatea de lichid depusă pe lamă trebuie să fie suficientă pentru a cuprinde întreaga suprafață a lamelei, dar să nu fie nici prea mare deoarece depășește marginile lamelei și în acest caz preparatul nu are suficientă stabilitate, se murdărește repede și nici nu poate fi lutat. Se întîmplă adesea ca să rămînă spații sub lamelă fără glicerină ; umplem acest gol punînd, cu ajutorul unei pipete, pe marginea lamelei atîta amestec glicerinat pînă cînd golul dispare. În cazul în care cantitatea de lichid depusă a fost prea mare, excesul poate fi absorbit de pe marginile lamelei cu ajutorul hîrtiei de filtru.

Astfel montate, preparatele pot fi păstrate în colecție luni de zile sau chiar ani. După un timp însă (variabil în funcție de concentrația în glicerină a amestecului utilizat) apa se evaporă ; ca tare sub lamelă apar bule de aer și astfel prepartul se deteriorează. Acestor preparate li se poate asigura o durabilitate mai mare prin lutare (v. pag. 35).

2. *Glicerină iodată* este un lichid de montare a preparatelor preconizat de Locquin (1952) și recomandat de Smith (1963); se prepară prin saturarea unei cantități de glicerină pură cu iodură de potasiu și iodură de mercur. Cele două ioduri se dizolvă alternativ, cîte puțin, pînă cînd ambele substanțe nu se mai dizolvă. Lichidul astfel obținut are un indice de refracție foarte înalt fapt ce-l face să fie foarte indicat pentru montarea directă a materialelor micologice, dar prezintă inconvenientul de a induce uneori contractarea **materialului.**

3. *Siropul de levuloză* constituie un mediu bun pentru montarea provizorie a materialelor. Fiind mai transparent decît glicerina de multe ori este preferat acesteia. Se prepară prin dizolvarea a 30 g de levuloză în 20 ml apă distilată, în timp de 24 ore, la temperatura de 37°C.

4. *Siropul lui Apathy* prezintă aceleași calități ca și precedentul și se obține prin amestecare în proporții egale a substanțelor : gumă arabică, zaharoză și apă distilată, iar ca antiseptic se adaugă amestecului cîteva cristale de timol.

5. *Lactofenolul Amann* este un reactiv micologic prin excelență, dar el poate fi utilizat cu rezultate foarte bune și pentru montarea altor preparate deoarece nu provoacă deformarea țesuturilor și pot fi păstrate timp îndelungat mai ales în cazul în care au fost lutate. Pentru preparare foarte indicată este următoarea rețetă :

acid fenic cristalizat (chimic pur) . .	10 g (20 g)
acid lactic	10 g (16 ml)
glicerină pură	20 g (31 ml)
apă distilată	10 g (20 ml)

(Se recomandă ca substanțele să fie cîntărite și nu măsurate volumetric).

Se dizolvă acidul fenic în apă distilată la cald și apoi se adaugă acidul lactic și glicerina. Amestecul proaspăt preparat este incolor. Se păstrează în sticle brune la întuneric deoarece în prezența luminii se brunifică și-și reduce astfel transparența, dar poate fi în continuare utilizat. Pentru obținerea unui lichid incolor se utilizează acidul fenic ce se prezintă sub formă de cristale incolore sau foarte slab colorate în roz. Contrar, se obține un lichid brun. Pentru montarea preparatelor se procedează ca și în cazul montării în glicerină apoasă, respectîndu-se întocmai aceleași indicații. În plus secțiunile introduse în picătura de lactofenol se încălzesc înainte de aplicarea lamelei pentru ca țesuturile să devină turgescente. Foarte bun pentru montarea materialelor uscate; prezintă și avantajul de a fi miscibil cu majoritatea coloranților.

6. *Lactofenolul Lepik* este o variantă a lactofenolului lui *Amann* preconizat de *Lepik*, în care apa este înlocuită cu alcool 96% și a cărui rețetă completă de preparare este următoarea :

acid fenic cristalizat (chimic pur)	10 g
acid lactic pur	10 g
glicerină pură	20 g
alcol etilic 96%	20 g

Se amestecă alcoolul cu glicerina și acidul lactic și apoi se adaugă acidul fenic. Dizolvarea este grăbită prin agitare. Se conservă în sticle brune la întuneric.

7. *Cloral lactofenolul Amann*, soluție preconizată și recomandată de *Langelon* ce constituie o variantă a lactofenolului *Amann*; are un indice de refracție mai mare (1,49) și provoacă adesea deformări ale celulelor și țesuturilor.

Compoziție :

hidrat cloral (cristalizat)	2 părți
acid fenic (cristalizat)	1 parte
acid lactic (pur)	1 parte

(părțile se referă la greutate și nu la volum)

Pentru clarificarea mai bună a preparatelor se indică adăugarea de salicilat de sodiu, făcînd astfel posibilă observarea celor mai fine detalii structurale. În acest caz rețeta de preparare este următoarea :

hidrat cloral (cristalizat)	4 părți
acid fenic (cristalizat)	4 părți
acid lactic (pur)	2 părți
salicilat de sodiu	1 parte

(de asemenea, substanțele se cîntăresc și nu se măsoară volumetric)

Preparare : se dizolvă acidul fenic în acid lactic la cald și apoi se adaugă celelalte substanțe.

8. *Cloralhidrat* — soluție utilizată îndeosebi pentru montarea preparatelor micologice, avînd următoarea compoziție :

cloralhidrat (cristalizat)	40 g
gumă arabică (cristalizată)	10 g
sirop de glucoză	5 g
acid acetic glacial	5 g
glicerină pură	5 g

Preparare : mai întîi se dizolvă guma arabică în 20 ml apă distilată (fără a se agita) ; se lasă în repaos 24 de ore, după care se filtrează prin vată de sticlă de două ori. Se prepară apoi siropul de glucoză astfel : se ia o anumită cantitate de glucoză pură (praf) și se dizolvă în apă călduță, după care se fierbe în baia mariană pînă cînd lichidul devine siropos. După prepararea acestor substanțe se pun într-un balon toate substanțele indicate în rețetă și se fierb în baia mariană 15—20 minute, pînă cînd se formează un lichid omogen, după care se transferă într-un borcan brun, cu dop rodat, unde se lasă în repaos două zile pentru decantarea impurităților. După acest repaos lichidul limpede de deasupra se transferă din nou în alt vas și este bun pentru a fi întrebuințat.

Lutarea

Toate substanțele de montare a preparatelor microscopice menționate pînă aici nu au proprietatea de a se întări și după un timp, parțial se evaporă. Acest impediment poate fi evitat prin lutarea preparatelor microscopice.

Lutarea se poate realiza cu ajutorul mai multor substanțe dintre care menționăm :

Lutul de parafină este cel mai adesea utilizat ; este un amestec de lanolină și colofoniu în proporțiile indicate mai jos :

lanolină anhidră (sau ceară de albine) . . . . . 2 părți (20%)
colofoniu (sacîz) . . . . . 8 părți (80%)
Se prepară astfel :

Lanolina (sau ceara de albine) se încălzește ușor (la foc mic), într-o capsulă de porțelan pînă la topirea completă. În acest moment se adaugă treptat (puțin cîte puțin) colofoniul sub formă de pulbere ; cu o baghetă de sticlă cele două substanțe se amestecă continuu pentru a grăbi dizolvarea colofoniului și omogenizarea mixturii.

Amestecul obținut se toarnă în cutii Petri, cutii de vată sau cristalizoare, unde se lasă să se răcească într-un loc ferit de praf.

Lutarea se face cu ajutorul unei tije metalice terminată cu o parte mai lățită și prevăzută cu un mîner izolator (fig. 17 A).

Tija încălzită bine (la flacăra unui bec bunzen, a unei lămpi de spirt sau altă sursă de căldură) se aplică pe lut, pe care-l topește și reține o parte din acesta. Lutul de pe tijă este rapid întins pe marginea lamelei. Operația se repetă pînă cînd întregul perimetru lamelar este complet și uniform lutat. Înainte de aplicarea lutului trebuie să avem grijă ca lama și marginea lamelei să fie perfect uscate fiindcă altfel lutul nu aderă la ele (fig. 17 B).

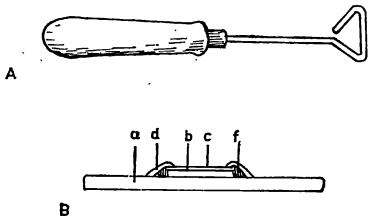


Fig. 17 — A — Tijă pentru lutarea preparatelor microscopice ; B — etanșeizarea preparatelor microscopice prin lutare : a — lama ; b — material biologic ; c — lamelă ; d — lut ; f — mediu de montare.

Lutarea asigură o durabilitate mai mare preparatelor deoarece împiedică evaporarea lichidului de sub lamelă și fixează lamela evitîndu-se astfel strivirea secțiunilor prin deplasarea inevitabilă a lamelei în timpul mînuirii preparatelor.

Lutul de parafină poate fi înlocuit cu soluția de lipit cauciucul care dă rezultate tot atît de bune. În plus prezintă avantajul că această soluție uscată poate fi ușor îndepărtată. Soluția lichidă se întinde uniform pe marginea lamelei după care se lasă să se usuce.

Lacul pentru unghii, cimentul *Thorner (Zuț sau Glyceel)* sînt adesea utilizate în acest scop.

9. *Glicerina gelatinată* este foarte mult utilizată în laboratoarele botanice deoarece este ușor de preparat, dă rezultate foarte bune și în plus, față de substanțele anterioare, asigură o stabilitate mult mai mare preparatelor, ne mai fiind necesară lutarea lor. Rețeta cea mai cunoscută de preparare este cea indicată de *Kaiser*, adică :

gelatină	7 g (1 parte)
glicerină (pură)	50 ml (7 părți)
apă distilată	42 ml (6 părți)
acid fenic (cristalizat)	1 g

Preparare : peste cele 7 g de gelatină (în prealabil tăiată mărunt sau pisată) se toarnă cei 42 ml apă distilată ; se lasă cca. 2 ore pentru înmuierea gelatinei, după care se adaugă glicerina și acidul fenic, amestecul încălzindu-se în baia mariană pînă se obține un lichid siropos, omogen. Se filtrează prin vată de sticlă și se toarnă într-un borcan de sticlă cu dop rodat și gît larg, unde se lasă 24 de ore pentru solidificare, după care poate fi utilizat. Amestecul astfel preparat trebuie să fie perfect transparent și incolor.

Pentru montarea preparatelor în glicerină-gelatinată se procedează în felul următor : se detașează din glicerina-gelatinată, cu ajutorul unui ac spatulat, o cantitate de cca. 2—3 mm^3 (cantitate variabilă în funcție de dimensiunile obiectului ce urmează a fi montat și cele ale lamelei) și se așează pe lamelă. Lamela se încălzește treptat la flacăra unei lămpi de spirt (evitîndu-se fieberea amestecului și deci formarea bulelor de aer) pînă cînd amestecul se topește complet. Pe lamă se așează secțiunile, iar lamela se rotește rapid cu 180° și se depune peste material. Preparatele sînt folosibile după 10—12 ore timp în care are loc solidificarea completă a amestecului. Acest procedeu prezintă impedimentul că este greu de apreciat (mai ales de către începători) momentul cînd trebuie oprită încălzirea lamelei și din această cauză se întîmplă ca amestecul să fiarbă și ca atare nu mai poate fi utilizat, iar operația trebuie luată de la capăt. Pentru a se evita acest neajuns se recomandă ca amestecul să fie topit în baia, mariană înainte de utilizare ; cu ajutorul unei baghete de sticlă sau a unei pipete (instilator) se ia cantitatea necesară din amestecul topit și se depune peste materialul de pe lamă, după care se așează lamela. Procedînd astfel avem garanția unor preparate reușite. Secțiunile (sau alte materiale) se pot monta direct din apă după o scurgere prealabilă pe hîrtia de filtru, sau după deshidratarea cu glicerină, lucru ce se realizează prin trecerea lor prin 5 vase cu amestec de glicerină și apă în următoarele proporții : 1/3 ; 1/2 ; 1/1 ; 2/1 și 1 (glicerină pură).

Prezintă avantajul de a suporta orice colorație, iar preparatele astfel montate pot fi păstrate în colecție ani de-a rîndul.

10. *Lichidul Karo* este recomandat de *Johansen* pentru montarea secțiunilor, înlocuind cu succes glicerina-gelatinată. Este un amestec format din părți egale de dextroză, dextrină și maltoză, în care materialul poate fi montat direct din apă sau alcool diluat. Prezintă avantajul că zaharurile din amestec nu cristalizează prin uscare.

11. *Balsamul de Canada* este o rășină naturală cu cea mai largă utilizare pentru întocmirea preparatelor microscopice durabile. Materialele ce urmează a fi montate în balsam trebuie deshidratate lucru ce se realizează prin trecerea lor succesivă prin seria de alcooli (15%, 30%, 55%, 75%, 85%, 95% și 100%), în fiecare concentrație ținîndu-se 15—30 minute. Alcoolul absolut se schimbă de 3 ori pentru a avea garanția unei perfecte deshidratări (pentru prepararea seriei de alcooli de o anumită concentrație se va apela la tabelele lui Gay-Lussac în care sînt indicate cantitățile necesare de alcool și apă ce urmează a fi amestecate pentru a se obține un alcool de o anumită diluție). Întrucît balsamul nu este miscibil cu alcoolul, în continuare, se va proceda la înlocuirea acestuia din țesuturi cu unul din solvenții organici — xilen sau toluen. Pentru aceasta secțiunile sînt trecute succesiv prin mai multe vase cu amestec de xilen și alcool în următoarele proporții : 1/2 ; 1/1 ; 2/1 ; 1, 1, 1, (xilenul pur se schimbă de 3 ori).

Secțiunile astfel tratate se întind pe lame, peste care se depun cu ajutorul unei baghete de sticlă 1—2 picături de balsam și se acoperă cu lamela. Preparatele se lasă 6—7 zile la temperatura camerei pentru uscare, după care pot fi analizate.

Pentru calitățile sale balsamul de Canada rămîne cea mai indicată substanță pentru montarea preparatelor a căror durabilitate este indefinită.

12. *Euparal:* Balsamul de Canada este azi tot mai adesea înlocuit cu o rășină artificială cunoscută sub numele de Euparal. Euparalul fiind miscibil cu alcoolul, secțiunile după deshidratare (urmînd acelaș procedeu), se montează imediat în eurapal ne mai fiind necesară înlocuirea alcoolului cu xilenul sau toluenul. Are aceleași particularități și dă aceleași bune rezultate ca și balsamul.

13. *Styrexul* — face parte tot din categoria rășinilor naturale ; se dizolvă în xilen sau benzen dar cel mai bine în terebentină. Este ușor de manipulat și dă rezultate foarte bune, datorită indicelui său ridicat de refracție și a calității de a se întări și de a nu îmbătrîni (indeosebi la montarea diatomeelor). În acelaș scop mai pot fi utilizate hiraxul, piperincolofonium, monobromonaftalena, raglărul, clorura de zinc arsenicoasă ș.a.

Odată montate preparatele microscopice trebuie etichetate. Eticheta se lipește pe partea superioară, la unul din capetele lamei. Pe etichetă se notează conținutul preparatului și data efectuării lui.

Păstrarea preparatelor se poate face în tăvițe, mape speciale din carton sau cutii de colecții, pe fiecare din acestea notîndu-se conținutul lor.

Astfel conservate și păstrate preparatele au o durabilitate indefinită, mai ales dacă ele sînt mînuite și examinate cu atenție.

După o perioadă preparatele se mai pot murdări sau prăfui ; se pot recondiționa prin ștergerea lamelei cu o cîrpă moale, curată și uscată sau înmuiată în alcool, xilol sau acetonă, operație ce se cere a se face cu multă atenție pentru a nu deteriora preparatele.

3. TEHNICA ÎNTOCMIRII PREPARATELOR MICROSCOPICE BOTANICE

Studiul morfo-anatomic al unor grupe de plante inferioare ca și cel cito-histologic al organelor vegetative și reproducătoare ale cormofitelor nu poate fi conceput fără obținerea unor preparate microscopice.

Un material biologic transparent, montat între lamă și lamelă într-un mediu adecvat, cu indice de refracție apropiat cu cel al sticlei, constituie un preparat microscopic.

Pentru realizarea unui preparat microscopic — fie efemer (de moment), fie durabil (fix) sînt necesare o gamă largă de materiale, ustensile și aparate.

Materiale : lame, lamele, medii de includere, piese biologice, seria de alcool, mixturile de alcool-xilen, coloranți, fixatori, javel, soc, parafină, albumină glicerinată, mordant, glicerină, vată, hîrtie de filtru.

Ustensile : Pensă, bisturiu, brici, microtom de mînă sau mecanic, lamă de ras, platină șofantă, lampă de spirt, tăvițe de porțelan, vase de sticlă diferite (vase Laveran, cutii Petri, cutii de vată, cristalizoare, fiole, cilndri gradați, capsule, pahare, cilindri Borell), baie de colorat lame, foarfeci diferite (fig. 18).

Aparate : Etuvă-termostatată, microscop ș.a.

Desigur că nu de fiecare dată sînt necesare toate materialele, ustensilele și aparatele menționate ; uneori, dacă dispunem de lame, lamele, un mediu de montare miscibil cu apa și un material biologic adecvat, putem întocmi o serie de preparate semipermanente sau chiar fixe. Necesitatea unora sau altora depinde de tehnica utilizată, caracterele materialului botanic, precum și de scopul urmărit. Rezultă, așadar, că există o gamă largă de metode prin care pot fi obținute preparate microscopice. Deși există o oarecare similitudine, o prezentare în ansamblu a variatelor metode este nu numai dificilă din punct de vedere teoretic ci și ineficientă din punct de vedere practic.

Pornind de la ideea că activitatea practică constituie o sursă inepuizabilă de cunoștințe vom încerca, în cele ce urmează, să prezentăm tehnica concretă de lucru pentru întocmirea unor variate tipuri de preparate microscopice botanice, fără a exagera în teoretizarea proceselor biochimice și biofizice ce însoțesc tratamentele succesive impuse de metodă.

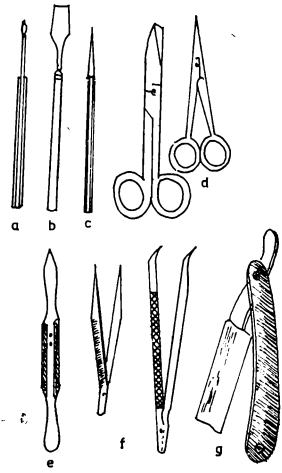


Fig. 18 — Ustensile de laborator : a — ac spatulat ; b — lopățică ; c — ac simplu ; d — foarfece ; e — bisturiu ; f — pense ; g — brici.

3.1. OBȚINEREA UNOR PREPARATE DE TALOFITE

În această mare unitate taxonomică a regnului vegetal — *Thallophyta* — sînt încadrate toate plantele inferioare, începînd cu flagelatele și terminînd cu briofitele (mușchii). Grup extrem de heterogen, care cuprinde circa 15 filumuri de plante, fiecare cu particularitățile sale distinctive. În cadrul plantelor inferioare pot fi evidențiate cu claritate unele trepte de organizare și de evoluție ale regnului vegetal pe baza cărora au fost elaborate o serie de ipoteze filogenetice și s-au întocmit arbori genealogici. Existența celorlalte viețuitoare, inclusiv a omului este strîns legată de unele specii de talofite. Prin urmare, cunoașterea aprofundată a talofitelor are o importanță excepțională atît din punct de vedere teoretic cît și practic.

Pentru realizarea acestui deziderat sînt necesare cercetări complexe de ecofiziologie, biologie, citochimie, morfo-anatomie, ș.a Indiferent de aspectul abordat, analiza microscopică este indispensabilă. În acest scop se pot întocmi două tipuri de preparate : preparate „de moment" și preparate durabile. Preparatele fixe sînt de preferat deoarece pot fi păstrate în colecție și pot fi analizate oricînd.

Pentru obținerea unor preparate de talofite sînt metode generale și metode speciale. Fără a contesta importanța metodelor generale, con-

sideräm că cele speciale sînt mai utile practicii, fapt pentru care acestea vor fi descrise în cele ce urmează, pentru fiecare grupă taxonomică de plante inferioare.

Întrucît metoda includerii în parafină este prezentată într-un capitol aparte, la fiecare unitate axonomică, va fi descrisă numai tehnica utilizată pentru obținerea preparatelor totale.

3.1.1. PREPARATE DE ALGE ALBASTRE-VERZI (CYANOBACTERII)

Algele albastre-verzi sînt procariote, prezente în special în biotopii acvatici (planctonice, bentonice, perifitonice)), dar și pe soluri umede, cortextul copacilor, ziduri și ghivecele florilor din sere. Cele mai comune specii pot fi recoltate folosind una din metodele descrise anterior (v. pag. 14).

Prelucrarea Cianobacteriilor, în vederea obținerii unor preparate microscopice este diferită în funcție de structura pe care intenționăm să o evidențiem și tipul de preparat (de moment sau permanent, total sau secționat).

Preparate totale (semi) permanente pot fi astfel realizate :

— *Fixarea :* în formalină 3—5% sau în Bouin, timp de 5—6 ore.

— *Spălarea :* mai întîi, de cîteva ori în alcool de 90%, apoi în apă.

— *Colorarea :* cu albastru de toluidină (soluție apoasă 1%), albastru de metilen (soluție apoasă de 1% la care se adaugă 10 g de alaun de K), albastru de crezil (soluție apoasă 0,1%), roșu neutru (soluție apoasă 0,1%). hematoxilină ferică (soluție apoasă 0,5%), roșu de ruteniu (soluție apoasă 0,1)%, eritrosina (soluție apoasă 1%), violet de gentiana (soluție apoasă sau alcoolică 1%). În cazul utilizării hematoxilinei materialul înainte de colorare trebuie mordansat în alaun de fier, soluție apoasă 1—2%.

Timpul de colorare diferă de la colorant la colorant. De regulă în circa 10′ se realizează o colorație optimă ; excepție fac hematoxilina ferică în care materialul trebuie ținut 2—3 ore și picroindigoucarminul care realizează o bună colorație numai după cîteva zile.

Spălarea ; de mai multe ori în apă distilată (uneori băile de apă alternînd cu cele de alcool).

Montarea ; Celulele sau filamentele algale se izolează (sau mai bine zis se concentrează) prin centrifugare. După îndepărtarea supernatantului (apei), cu pipeta (în cazul formelor unicelulare și coloniale) sau cu pensa (în cazul formelor pluricelulare-filamentoase) se depun pe lamă cîteva celule algale sau cîteva filamente. Prin intermediul unor ace simple sau spatulate se izolează cît mai bine celulele sau filamentele. Peste material se depun 1—2 picături de glicerină-apoasă sau gelatină-glicerinată topită. Preparatelor montate în glicerină apoasă li se poate mări durabilitatea prin lutare (v. pag. 35).

Preparatele fixe, montate în balsam de Canada, se pot realiza după trecerea materialului colorat și spălat prin seria de alcool (pentru deshidratare) și seria mixturilor de alcool-xilen.

Întrucît celulele cianoficeelor posedă o colorație naturală datorită pigmenților clorofilieni (clorofila a, b) și ficobilinici (ficocianina, ficoeritrina) pe care-i conțin, unele taluri pot fi montate în glicerină sau gelatină fără a mai fi colorate artificial.

3.1.2. PREPARATE DE DIATOMEAE (BACILLARIOPHYCEAE)

Diatomeele sînt alge unicelulare și coloniale caracterizate de un perete puternic mineralizat (incrustat cu SiO_2) format din două valve sau teci (hipoteca și epiteca) de regulă frumos ornamentate. Cromatoforii clorofilieni (clorofila a și c) sînt mascați de pigmenții carotenoizi (beta-carotenul) și xantofiliem (fucoxantina, diadinoxantina, diatomoxantina). Substanța de rezervă caracteristică este crisolaminarina.

Cuprinde numeroase specii bentonice, planctonice și perifitonice, prezente în toate bazinele acvatice (pîrîuri, rîuri, lacuri, bălți, în mări și oceane) din care pot fi recoltate cu fileul, prin răzuirea perifitonului sau stoarcerea macrofitelor acvatice.

Concentrarea materialului se realizează prin filtrare și centrifugare.

Pentru diatomee se pot întocmi două tipuri de preparate ; totale și preparate de perete celular.

Pentru analiza morfo-anatomică a celulei, materialul se montează pe lamă în glicerină sau gelatină-glicerinată în starea în care a fost recoltat. În astfel de preparate pot fi observate toate elementele structurale ; citoplasma, nucleul, cromatoforii, picăturile de olei și într-o oarecare măsură și caracterele peretelui.

Întrucît peretele celular include o serie de caractere de primă importanță în identificarea taxonilor este necesar a se alcătui și astfel de preparate. La alcătuirea unui preparat cu pereți celulari de diatomee se are în vedere îndepărtarea protoplastului care maschează detaliile structurale (ornamentațiile) ale tecilor.

Practic un astfel de preparat poate fi astfel realizat :

— Materialul recoltat se centrifughează ; supernatantul se decantează, iar din sediment se absoarbe cu pipeta o parte din material. Pe fiecare lamelă se pun 1—2 picături, care se întind pe întreaga suprafață a acesteia. După evaporarea apei, lamelele cu material se așează pe plăcuțe de mică, care la rîndul lor se ordonează pe o sită de azbest (sau placă metalică). Pe o plită încinsă sau la flacăra unui bec bunzen se ard circa 4—6 (12) ore pînă întreg materialul organic este distrus, rămînînd numai tecile silicoase ale celulelor de diatomee. Montarea se face în styras sau balsam de Canada. Pe lamă se pun 1—2 picături de balsam, iar peste materialul de pe lamelă 1—2 picături de xilen, care vor îndepărta aerul și vor facilita penetrația balsamului printre tecile silicoase. Rapid lamela (cu materialul în jos) se aplică peste balsamul de pe lamă. Preparatele sînt imediat examinate la microscop, triate, reținîndu-se cele corespunzătoare, care vor fi puse la uscat în etuvă termostat.

3.1.3. PREPARATE DE ALGE VERZI (CHLOROPHYTA)

Chlorophyta — reprezintă unul din filumurile centrale ale subregnului *Thallophyta*, un mare și important nod filogenetic în care își au originea numeroase grupe de talofite și după mulți autori și cormofitele inferioare.

Algele verzi sînt de o extremă heterogenitate ; poate singurul caracter comun mai important, care a permis taxonomilor să le grupeze în-

tr-un filum, este culoarea verde a cromatoforilor : pigmenții clorofilieni dominanți, maschează pe cei carotenoizi și xantofilieni. Diferențele existente între organele și celulele sexuate separă filumul *Chlorophyta* de filumul *Charophyta*.

Talul-algelor verzi se caracterizează printr-o extremă diversitate morfologică și anatomică. Analiza detaliată a aspectelor morfo-anatomice și ecofiziologice poate conduce la desprinderea unor concluzii ce interesează în egală măsură citologia și filogenia plantelor.

Din multitudinea aspectelor ce pot fi evidențiate în preparatele microscopice sugerăm cîteva care ni se par esențiale :

— treptele de organizare morfo-anatomică a talului ;

— diversitatea formei și structurii cromatoforilor ;

— organe și celule sexuate ; procesul de conjugare ș.a.

În linii generale, tehnica de întocmire a preparatelor microscopice este similară cu aceea de la Cianoficee. Apar unele diferențe cerute de particularitățile materialului algal, asupra cărora ne vom reține în cele ce urmează.

Recoltarea — algelor verzi din apă, de pe sol, stînci sau cortexul arborilor se poate face prin metodele indicate anterior (v. pag. 14). Pentru unele cercetări citofiziologice se poate apela la materialul din culturi pure, sterile, existente în laboratoare specializate.

Algele unicelulare și coloniale, ca și unele forme filamentoase pot fi concentrate prin centrifugarea probei recoltate.

Unele cloroficee pot fi imediat montate în glicerină sau gelatină glicerinată, fără nici un tratament preliminar (nefixat și necolorat). Pentru evidențierea unor componente celulare este necesar a se urma o tehnică adecvată, care include fixarea și colorarea diferențiată a materialului.

Fixarea — se face în funcție de scopul urmărit. Pentru preparatele totale se va urmări o conservare fidelă nu numai a structurii celulei algale ci și a culorii cromatoforilor ; aceste rezultate sînt asigurate de lactofenolul-cupric a cărei compoziție este următoarea :

— fenol	20 g
— acid lactic	20 g
— glicerină	40 g
— clorură de cupru	0,2 g
— acetat de cupru	0,2 g
— apă distilată	20 ml

Algele la care se urmărește evidențierea unor detalii structurale vor fi fixate în amestecul cromo-acetic, format din :

— acid cromic	1 g
— acid acetic glacial	1 ml
— apă distilată	100 ml

Colorarea. Materialul este ținut în fixator circa 12 ore (peste noapte), după care spălat abundent în apă și colorat cu hematoxilină ferică (pentru nuclei), roșu de Congo, verde lumină sau clorură de zinc iodată (pentru peretele celular), safranină sau verde de metil (pentru citoplasmă și cromatofori).

Rezultate foarte bune, pentru evidențierea materialului genetic, îl dă metoda rapidă de colorare cu fuxină bazică și carmin acetic (v. pag. 144, 146) (fixare în *Carnoy* 2—24 ore; hidrolizá în HCl în 12—16′ în termostat la 60°C; colorare în fuxină bazică și supracolorare cu carmin acetic).

Montarea. Se poate realiza în glicerină, gelatină-glicerinată și în balsam de Canada, după o prealabilă deshidratare.

Obs. Dacă formele unicelulare, coloniale și pluricelulare filamentoase pot fi prelucrate și analizate în totalitate, formele pluricelulare, lamelare trebuie secționate (cu briciul de mînă sau la microtomul mecanic). Secțiunile realizate cu briciul de mînă vor fi prelucrate prin tehnica indicată anterior, iar cele realizate la microtomul mecanic urmînd tehnica includerii în parafină. Și în acest caz fixatorii și coloranții adecvați fiind cei menționați.

Lucrînd cu diverse specii de alge verzi aparținînd la tipuri diferite, colecțiile de preparate pot ilustra diversitatea morfo-anatomică a talului, cromatoforilor, caracterele complementului cromozomial.

Conjugarea — reprezintă un tip particular de fecundație întîlnit la reprezentanții ordinului *Conjugales (Spirogyra, Zygnema, Mougeotia, Closterium* ș.a.). Un material adecvat pentru ilustrarea acestui proces îl constituie talurile filamentoase de *Spirogyra* aflate în plin proces de conjugare. Se fac preparate „in toto" (totale) — cu sau fără fixare și colorare, montate în glicerină sau, după o prealabilă deshidratare, în balsam de Canada.

3.1.4. PREPARATE DE ALGE BRUNE (FIL. PHAEOPHYTA) ȘI ROȘII (FIL. RHODOPHYTA)

Algele brune și roșii sînt în exclusivitate acvatice (bentonice) prezente în special pe platforma litorală a mărilor și oceanelor. Talul lor este în general pluricelular-filamentos, lamelar sau masiv-tridimensional, diferențiat în rizoid, cauloid și filoid. Acestei diferențieri morfologice îi corespunde și o complexitate anatomică, în structura talului masiv își face apariția plectenchimurile și pseudoparenchimurile (false țesuturi). Dacă la acestea mai adăugăm creșterea exclusiv apicală a talului, prin diferențierea unei celule inițiale, rezultă că algele brune și roșii au atins un grad superior de organizare și evoluție comparativ cu algele verzi. Culoarea lor brună și respectiv roșie este determinată de prezența unor pigmenți suplimentari (fucoxantina pentru *Phaephyta*, ficoeritrina și ficocianina pentru *Rhodophyta)* care maschează pigmenții clorofilieni asimilatori. La algele brune și roșii interesează în egală măsură morfo-anatomia talului, structura celulelor și a organelor reproducătoare, fazele fenologice esențiale din cadrul ciclului vital ș.a.

Recoltarea algelor brune și roșii se face prin cufundări și prin dragarea platformei litorale. Uneori numeroase specii pot fi colectate de pe plajă, aduse de valuri, care au determinat desprinderea lor de pe stîncile litorale în perioadele cînd marea a fost mai agitată.

În funcție de gradul de organizare al talului și de scopul urmărit se pot întocmi două tipuri de preparate: „in toto" și ca secțiuni.

Fragmentele din talurile filamentoase pot fi montate fără a fi necesară secționarea. Tot astfel se poate proceda și cu organele sexuate (oogoane și anteridii) de la speciile cu tal filamentos.

Fixarea. Înainte de montare se recomandă ca materialul să fie însă fixat în amestecul cromo-acetic sau formol 10% în apă de mare, timp de circa 10—12 ore.

Colorarea. După o spălare într-o serie gradată de apă de mare și apă distilată, iar în final de cîteva ori numai în apă distilată, se face dubla colorare a materialului cu hematoxilină-ferică și orange G sau cu brun Bismarck (soluție alcoolică 1% — în alcool 70%) și verde de metil.

Montarea. După o prealabilă deshidratare materialul se montează în balsam de Canada. Pentru evidențierea structurii talului în diferitele sale regiuni și a organelor reproducătoare (oogoane și anteridii) de la algele brune evoluate sînt necesare secțiuni executate cu mîna sau la microtom. Secțiunile realizate cu mîna vor fi prelucrate după tehnica descrisă mai sus.

Pentru realizarea unor secțiuni la microtomul mecanic este necesară includerea materialului în parafină. Tehnica de lucru este în general similară cu aceea descrisă la pag. 162 cu unele adaptări și anume :

Fixarea se va realiza fie în formol 10% în apă de mare, fie într-un amestec format din :

— apă de mare (filtrată) . . . . . 100 ml
— acid cromic . . . . . 1 g
— acid acetic glacial . . . . . 1 ml
— saponină (se adaugă în momentul utilizării fixatorului) . . . . . 0,5 g

Timp de fixare : 4—24 ore în funcție de particularitățile morfo-anatomice ale materialului.

Deshidratarea se face nu în seria obișnuită de alcool ci într-o serie succesivă formată dintr-un amestec de apă de mare filtrată, apă distilată și alcool etilic absolut, în una din următoarele proporții : 90/5/5 ; 80/10/10 ; 65/20/15 ; 50/30/20 ; 35/35/30 ; 20/40/40. În continuare materialul este imersionat în alcool butilic terțiar 50%, iar de aici mai departe în parafină.

Deparafinarea secțiunilor se face în alcool etilic 70%.

Colorarea se realizează imediat, fără hidratare, prin imersionarea lamelor cu secțiuni într-o soluție alcoolică 1%, de Bismarck, în decurs de 10—15′ (20′). Excesul de colorant din secțiuni este îndepărtat prin cîteva spălări rapide ale lamelor în alcool 50%, după care sînt din nou colorate cu verde de metil timp de 5—10′. Dacă materialul este supracolorat este necesară o diferențiere, operație ce se realizează cu amestec format din eugenol, alcool etilic absolut și xilen 2/1/1. Diferențierea este oprită prin spălarea repetată a lamelor în xilen, după care se face montarea în balsam de Canada.

3.1.5. PREPARATE DE CIUPERCI (FIL. FUNGI=MYCOPHYTA)

Ciupercile reprezintă cea mai mare unitate taxonomică de plante inferioare, fiind descrise pînă în prezent peste 200.000 de specii. Ca saprofite sau parazite pe plante și animale sînt prezente pretutindeni, în toate mediile de viață.

Aparatul vegetativ al ciupercilor se caracterizează printr-o largă diversitate morfologică; el poate fi un gimnoplast, un plasmodiu, un dermatoplast sau un miceliu. Miceliul constituie de fapt aparatul vegetativ caracteristic majorității grupelor taxonomice ale filumului fungi.

Ciupercile se caracterizează și printr-o mare diversitate a formelor de înmulțire vegetativă, asexuată și sexuată. Se individualizează de asemenea de celelalte filumuri ale regnului vegetal și prin varietatea tipurilor de spori generați, procese sexuate și cicluri de viață particulare. Așadar, cercetarea aprofundată a ciupercilor interesează în egală măsura taxonomia-filogenetică, morfologia plantelor și ecologia, cît și practica știut fiind că unele ciuperci, prin parazitismul lor, pricinuiesc mari pagube economiei, iar altele, datorită principiilor activi pe care-i produc sau substanțelor nutritive pe care le conțin, sînt utile omului.

Cercetarea morfo-anatomică sau biochimică atît a ciupercilor inferioare cît și a celor mai evoluate, nu poate fi realizată fără întocmirea unor preparate microscopice. În acest scop au fost descrise numeroase tehnici în funcție de caracterele morfo-anatomice și ecofiziologice ale taxonului ce urmează a fi prelucrat. O prezentare chiar generală a metodologiei utilizate în microscopia micologică ar necesita foarte mult spațiu. Ca urmare, în cele ce urmează, ne vom limita în a prezenta tehnica de lucru pentru realizarea unor preparate microscopice de mucegaiuri saprofite și ciuperci foliicole.

3.1.5.1. Preparate de mucegaiuri (Mucor, Rhyzopus, Aspergillus, Penicillium)

Materialul necesar se obține prin cultivarea acestor taxoni pe medii naturale sau sintetice, sterile, în laborator (ex. Sabourand, Czapek, cartof, dextroză, agar ș.a.).

În faza fenologică corespunzătoare (ex. în momentul sporulării) miceliul se recoltează. Se trece de cîteva ori prin alcool 70% pentru îndepărtarea apei, a bulelor de aer și parțială a sporilor care împiedică analiza miceliului dacă sînt prea abundenți. Pe lamă, în 1—2 picături de alcool, se depun cîteva hife miceliene, care prin intermediul a două ace spatulate se răsfiră cît mai bine. Înainte de evaporarea totală a alcoolului se depun peste material 1—2 picături de lactofenol *Amann* și se aplică lamela. Lactofenolul realizează concomitent fixarea, clarificarea și conservarea materialului și chiar colorarea, dacă în lactofenol se dizolvă un colorant adecvat (ex. bleu-coton).

Lutarea, ce se impune pentru a evita evaporarea lactofenolului, se poate face cu glicerol.

Un procedeu mai eficient constă în plasarea unei lamele sterile pe suprafața mediului de cultură gelozat, în imediata apropiere a unei colonii cu creștere activă. Miceliul prin creștere se va extinde și pe suprafața lamelei. La momentul oportun lamela se ridică de pe suprafața mediului și după o prealabilă examinare la microscop se montează pe lamă în lactofenol sau în bleu-coton în lactofenol.

3.1.5.2. Preparate de ciuperci foliicole

Miceliile ciupercilor endoparazite inter- și intracelulare pot fi puse în evidență prin secționarea și colorarea țesuturilor plantei gazdă cu

coloranți specifici. Secțiunile se pot executa cu mîna liberă, la microtomul mecanic, după includerea materialului în parafină, sau la criotom, urmînd tehnicile caracteristice histologiei vegetale (v. pag. 156—171).

Secțiunile „de mînă" și cele realizate la criotom sînt preferate înaintea celor incluzionate în parafină deoarece conservă mai bine caracterele morfo-anatomice ale ciupercii.

Materialul biologic poate fi proaspăt sau conservat (fixat în unul de fixatorii micologici : **Buller, Garnoy, Fleming**, acidul osmic (v. pag. 108—135).

Coloranții utilizați în cito-histologia vegetală sînt întrebuințați și pentru colorarea secțiunilor cu material micologic. Dintre coloranții specifici-micologici menționăm : bleu Coton în factofenol, în acid lactic sau în acid acetic, albastru de tripan în lactofenol, fuxină acidă, picronigrozină în lactofenol (coloranți în special citoplasmatici), verde de metil în glicerină-gelatinată, verde de Janus (coloranți citoplasmatici, mitocondriali și ai membranelor celulare). Giemsa, carminul acetic și fuxina bazică (coloranți nucleari).

Secțiunile colorate pot fi montate în unul din următoarele medii : lactofenolul Amann, cloral-lactofenolul, acid lactic, glicerină pură, ulei de parafină ș.a. Preparatele montate în oricare din aceste lichide vor fi lutate. Montarea se poate realiza, de asemenea, în gumă arabică sau în balsam de Canada.

Preparate micologice cu secțiuni prin carpoforii *Acsomycetelor* și *Basidiomycetelor* se obțin urmînd, în linii generale, tehnica descrisă pentru ciupercile foliicole.

4. MICROSCOPIE ŞI MICROFOTOGRAFIE

O condiţie esenţială pentru obţinerea unor microfotografii de bună calitate este aceea de a cunoaşte cît mai amănunţit aparatura folosită în acest scop; modul de alegere a opticii unui microscop, astfel încît acesta să dea un randament cît mai mare.

Considerăm că este necesar ca înainte de toate să se facă o prezentare a microscopului optic (fotonic) de laborator.

4.1. DESCRIEREA MICROSCOPULUI

Microscopul optic sau fotonic, este un aparat optic care permite mărirea organismelor microscopice, a structurilor vegetale şi animale, datorită unei combinaţii de lentile, cu ajutorul cărora se obţine o imagine mult mărită, virtuală şi răsturnată.

Microscopul optic este alcătuit din două părţi componente: *partea mecanică* şi *partea optică* (Fig. 19).

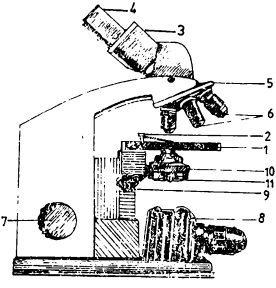


Fig. 19 — Părţile componente ale microscopului optic (fotonic): 1 — platină; 2 — cavaleri; 3 — tubul microscopului; 4 — ocular; 5 — revolver; 6 — obiective; 7 — viza micrometrică; 8 — lampa pentru iluminare; 9 — viza condensatorului; 10 — condensatorul; 11 — diafragma iris.

Partea mecanică.

Este formată din stativul microscopului (piciorul microscopului), care are forma unei potcoave; din partea centrală a acesteia se ridică un stativ metalic pe care sînt fixate, *platina* (măsuţa port-obiect) şi *tubul microscopic* (tubul port-ocular).

Stativul metalic sau mînerul microscopului are rolul în susținerea tubului microscopic care poate fi vertical sau curbat, în funcție de tipul microscopului și poate fi orientat în unele cazuri înainte sau înapoi în funcție de cerințele observării.

Platina (măsuța port-obiect) — (Fig. 20 a, b, c, d) poate fi rotundă sau pătrată, prevăzută în partea centrală cu o deschidere circulară sau

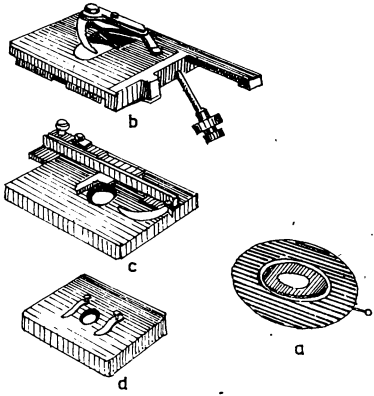


Fig. 20 — Tipuri de platine microscopice: a — platină sferică universală; b — platină cu vernier gradat; c — platină combinată cu cărucior; d — platină fixă cu cavaleri.

alungită prin care pătrund razele de lumină reflectate de oglinda microscopului și trimise prin condensor la obiect.

La microscoapele cu platină pătrată sau dreptunghiulară, în spatele deschiderii și pe una din laturile măsuței (platinei) se află cîte o bară metalică gradată în centimetri, cea din spatele deschiderii fiind lungă aproape cît latura respectivă a platinei, iar cea laterală mai scurtă.

În lungul lor se mișcă cîte un vernier împărțit în 10 diviziuni, egale cu 9 diviziuni de pe barele de metal. Cu ajutorul vernierelor și al gradațiilor de pe barele metalice se poate stabili poziția sectorului ales din preparatul microscopic. În fața barei metalice mai mari se află două lame metalice flexibile între care se fixează lama port-obiect și care se deplasează spre dreapta și stînga cu ajutorul a două butoane.

Prin mișcarea lamei cu preparatul este posibilă examinarea acestuia pe o suprafață cît mai mare, precum și efectuarea unor măsurători microscopice.

La tipurile de microscoape mai vechi, ca de exemplu la cele cu platină rotundă, deplasarea lamei port-obiect pe platină se face cu ajutorul unui dispozitiv numit „cărucior".

Acesta este alcătuit dintr-o bară orizontală și două bare laterale între care se fixează lama port-obiect (preparatul microscopic), iar miș-

carea lamei pe platină se face de asemenea cu ajutorul a două şuruburi laterale.

La microscoapele cu platină rotundă, în locul căruciorului, fixarea lamei port-obiect (a preparatului microscopic) pe platină se face cu ajutorul a două lame metalice flexibile numite cleme („cavaleri" sau „valeţi").

Măsuţa microscopului se poate mişca în faţă sau lateral în raport de claritatea secţiunii, folosindu-se de cadrul mobil care se manevrează cu ajutorul celor două şuruburi, aşezate de o parte şi de alta a măsuţei.

Tubul microscopului (tubul port-ocular) — reprezintă o parte importantă a microscopului care are rolul de a susţine partea optică propriu-zisă, adică *ocularul (ocularele)* şi *obiectivele* care sînt înşurubate într-un dispozitiv numit revolver. (Fig. 21 c), care prin rotire poate

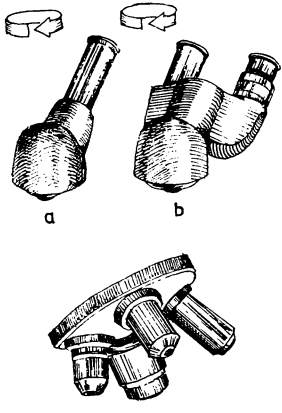


Fig. 21 — Tuburi microscopice înclinate şi revolver. a — monocular; b — binocular; c — revolver cu patru obiective.

aduce în axul microscopului obiectivul dorit. Tubul este cilindric şi se poate deplasa pe verticală cu ajutorul unei cremaliere (şină dinţată) ceea ce permite fixarea imaginei în focar. Deplasarea tubului microscopului pe cremalieră se face cu ajutorul *vizei macrometrice*, iar punerea la punct a imaginii se realizează folosind *viza micrometrică*.

Aceste două vize pot fi situate fie lateral, de o parte şi de alta a tubului microscopic, fie de o parte şi de alta a stativului, la baza acestuia.

Tuburile microscopului pot fi : drepte monoculare, înclinate monoculare şi tuburi binoculare drepte sau înclinate (Fig. 21 a, b).

În cazul microscoapelor binoculare, distanța dintre cele două tuburi port-ocular poate fi reglată în funcție de distanța inter-pupilară a observatorului. În plus, unul din cele două tuburi are un dispozitiv de punere la punct folosit în cazul când între cei doi ochi ai observatorului există o diferență dioptrică.

Partea optică

Partea optică a microscopului este formată din : 1. *Sistemul de iluminare* și 2. *Sistemul optic propriu-zis.*

Sistemul de iluminare

Intensitatea și calitatea luminii are un rol important în stabilirea puterii de rezolvare a unui microscop. Acestea sînt controlate și reglate de sistemul de iluminare format din : *sursa de lumină, oglindă, condensator și diafragma iris.*

Sursa de lumină — poate fi naturală (solar) sau artificială (un bec cu incandescență). Cea mai avantajoasă iluminare a preparatului pentru studiul microscopic și pentru microfotografiere este iluminarea artificială-electrică. Nu se **recomandă de loc iluminarea naturală**, întrucît ea este variabilă ca intensitate, în funcție de anotimp, oră și starea cerului. Drept sursă de iluminare se alege o lampă fixă care dă o lumină albă și uniformă.

Iluminarea ideală este dată de o lampă cu filament punctiform, alimentată la joasă tensiune (6 v, 5 v). Montată într-un tub metalic, acoperit la capăt cu un geam mat și cu o diafragmă de tip iris, care ne permite să îngustăm sau să **mărim diametrul cîmpului întunecat** și lămpide 15 W, de voltaj scăzut cu transformator în trepte, folosite pentru analizele în cîmp închis, deschis și contrast, cu toate scările de mărime pentru microfotografiere și proiecție (Fig. 22 a, b, c, d).

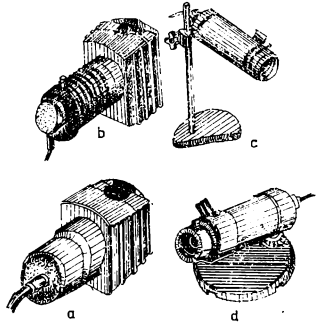


Fig. 22 — Tipuri de lămpi de microscopat : a — lampă cu 25 w cu cîmp dschis ; b — lampă cu 15 w cu transformator în trepte cu cîmp deschis și constant ; c, d — lămpi reglabile cu diafragmă.

Microscoapele cele mai moderne, prezintă un sistem de iluminare, situat în talpa microscopului care dă o lumină constantă ce este proiectată direct în condensator.

Oglinda (plan-concavă) este fixată sub condensatori (la unele microscoape înglobată în talpă) și are rolul de a capta razele luminoase, emise de izvorul luminos, și de a le proiecta sub forma unui con luminos pe lentilele condensatorului.

Fața plană a oglinzii se folosește cînd izvorul luminos este suficient de puternic și îndepărtat, iar cea concavă numai în situația în care lumina este slabă și apropiată.

Condensatorul — se află situat sub platina microscopului și poate fi apropiat sau îndepărtat de acesta prin intermediul unui șurub.

El reprezintă un sistem optic format din 2—3 lentile convergente care au rolul de a concentra asupra obiectivului razele de lumină reflectate de oglindă. De condensator este fixată *diafragma-iris*. De asemenea, la condensator între oglindă și lentile, este anexată o piesă metalică rotundă pe care se pune un disc de sticlă, alb-lăptoasă sau albastră — numită *filtru*, necesar pentru anumite examene.

În mod obișnuit se folosesc următoarele tipuri de filtre : *mate* (alb-lăptoase), care dau o lumină difuză și *colorate*.

Filtrul albastru este folosit împreună cu surse de lumină artificială, observînd o parte din razele roșii.

La microfotografiere se folosesc filtre speciale ; ele se aleg ținîndu-se seama de coloratia preparatului, de intensitatea luminii și de specificul emulsiei fotografice.

Folosirea condensatorului depinde direct de calitățile obiectivului. Condensatoarele au o apertură redusă. În cazul obiectivelor slabe, condensoarele se diafragmează.

La un obiectiv cu apertură mare, trebuie să se folosească de asemenea un condensor cu apertură mare.

Dintre condensoarele cele mai folosite citâm : (Fig. 23 a, b, c, d, e, f, g, h).

Condensoarele Abbe cu două lentile — cu apertura de 1,20. Aceste condesoare nu sînt convenabile în cazul folosirii obiectivelor puternice cu imersie și nu dau rezultate la încercări pretențioase care au putere de rezoluție mare.

La lucrările curente pot fi folosite cu bune rezultate următoarele condensoare :

— *Condensoarele Abbe cu trei lentile*. Au apertura 1,3. Acestea sînt cele mai bune, aberația de sfericitate fiind în parte corectă.

— *Condensoarele aplanatice Zeiss*, care produc o imagine corectă a sursei luminoase și dau rezultate satisfăcătoare în lumină monocromatică verde.

— *Condensoare acromatice* — sînt corectate pentru toate aberațiile. Condensorul este compus din garnituri de 5—6—7 lentile ; el dă rezultate excelente în lucrări fine și în microfotografie. Avînd o bună corecție este permisă folosirea lui cu deschiderea completă. Cu ajutorul acestui tip de condensor se utilizează complet puterea de rezoluție a celor mai bune obiective.

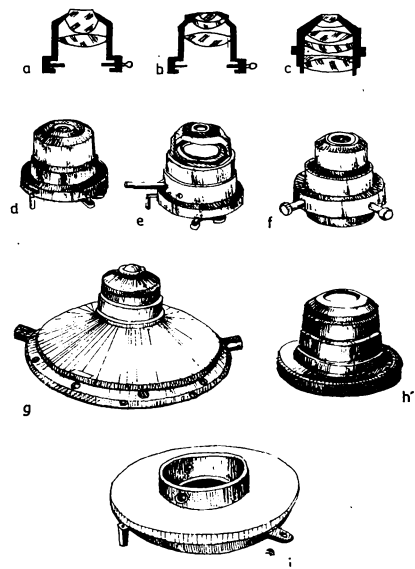


Fig. 23 — Tipuri de condensatoare : a — condensator de tip Abbe (aparatura 1,20) ; b — condensator tip Abbe modificat (apertura 1,30) ; c — condensator acromatic cu imersie (apertura 1,40) ; d — condensator cu două lentile (apertura 1,25), cu diafragmă și compartiment pentru filtre ; e — condensator cu două lentile (apertura 0,90) cu lentilă frontală mixabilă ; f — condensator cu imersie pentru cîmp mare ; g — condensator cu contrast cu 6 diafragme, inel și diafragmă iris de deschidere cu cîmp deschis, cîmp închis, contrast de fază, contrast anoptral ; h — condensator universal pentru microscoape didactice ; i — diafragmă iris.

— *Condensoarele cu cuarț* — sînt folosite împreună cu obiectivele monocromatice pentru fotografierea cu raze ultraviolete.

— *Diafragma iris* (Fig. 23 i), este formată din mai multe lame subțiri de oțel și se fixează de condensor. Prin apropierea sau depărtarea acestor lame cu ajutorul unei mici manete se creiază o deschidere mai mare sau mai mică care reglează fascicolul de lumină ce trece prin condensor, permițînd selectarea razelor de lumină, înlăturînd razele laterale care determină aberații în formarea imaginii.

Sistemul optic propriu-zis

Reprezintă partea cea mai importantă a unui microscop. Calitatea imaginii depinde în primul rînd de performanțele tehnice ale sistemului optic care este format din : *obiective* și *oculare*.

1. *Obiectivul* microscopului este format din mai multe lentile convergente fixate la capătul unui tub cilindric, filetat ce se înșurubă în revolver. Fiecare revolver prezintă 4—5 orificii în care pot fi înșurubate

tot atîtea obiective cu putere de mărire și apertură numerică foarte diferită care pot fi schimbate după necesitate prin rotirea revolverului.

În complexul optic al obiectivului, prima sau primele grupe de lentile asigură puterea măritoare a obiectivelor, iar restul grupelor de lentile asigură corecțiile aberațiilor sferice și cromatice.

Obiectivele sînt de două feluri : *uscate* și *umede*.

Obiectivele uscate, sînt obiective mici, cu putere de mărire de 10 X, 20 X, 40 X, 60 X, numite astfel, deoarece mediul care se interpune între lentila frontală a obiectivului și preparat este aerul.

Obiectivele umede (cu imersie), sînt obiectivele mari, cu putere de mărire maximă (90 X, 120 X), și la ele se folosesc un lichid intercalat între lentila frontală a obiectivului și preparat.

Prin folsirea unui lichid de imersie cum ar fi, uleiul de cedru 1,515% unisol 1,52% ulei de parafină 1,47% ulei de ricin 1,48% glicerină apoasă, tot spațiul dintre preparatul microscopic și lentila frontală a obiectivului devine omogen în ceea ce privește *indicele de refracție*.

Se știe că atunci cînd o rază de lumină trece printr-un mediu mai dens într-un mediu mai puțin dens, este reflectată depărtîndu-se de normală. Raza de lumină care străbate preparatul microscopic, după ce trece prin lama de sticlă ajunge în stratul de aer care desparte preparatul de obiectiv. Prin fenomenul de refracție, o parte din razele reflectate numai pot pătrunde în obiectiv. Din această cauză, imaginea rezultată este neclară și slab luminată.

Pentru a face ca întregul fascicol de raze care luminează preparatul să intre în obiectiv se interpune între acesta și preparat un strat de ulei de cedru (sau alt lichid de imersie), care are un indice de refracție egal cu cel al sticlei.

În acest fel razele de lumină numai suferă fenomenul de refracție, intrînd în obiectiv, unde formează o imagine clară, luminoasă. Lichidele de imersie folosite trebuie să aibă în afara unui indice de refracție potrivit și alte însușiri ca : nu trebuie să fie volatile, să nu decoloreze preparatele, să nu atace partea metalică a obiectivului, să nu dizolve montura lentilelor ș.a.

Uleiul de cedru sau alt lichid de imersie folosit în microscopie se păstrează în sticluțe bine astupate, pentru a nu se usca sau a se îngroșa, picătura necesară se ia cu o baghetă subțire de sticlă, în așa fel să nu cadă ulei pe platina microscopului. Dacă totuși aceasta se întîmplă, picătura se șterge cu degetul sau cu o bucată de tifon înmuiată în xilol.

Capacitatea unui obiectiv de a reda distinct conturul unui obiect este influențată de sistemele optice simple, de două abateri de la schema ideală de formare a imaginii și anume :

Datorită lor, imaginea formată de o lentilă simplă cu suprafețe sferice prezintă două defecte : 1. imaginea unui punct apare ca un cerc (aberația sferică) ; 2. imaginea prezintă mai multe culori care nu există în microscop (aberație cromatică).

1. *Aberația sferică* (Fig. 24), apare datorită faptului că periferia lentilei refractă lumina mai mult decît porțiunea ei centrală. Ca urmare, razele periferice focalizează pe ax la o distanță mai scurtă de lentilă decît cele centrale, iar imaginea este deformată.

Lentilele la care s-a făcut corecția acestei aberații sînt numite *aplanatice (aplanate).*

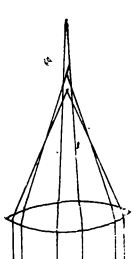


Fig. 24 — Aberația sferică a lentilelor.

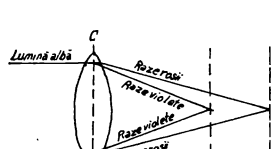


Fig. 25 — Abrația cromatică a lentilor.

2. *Aberația cromatică* (Fig. 25), este produsă de faptul că razele de lumină albă refractate prin lentile sînt dispersate în culorile lor componente și formează un spectru.

Razele albastre sînt refractate mai mult și ajung într-un focar mai apropiat de lentile, decît cele roșii. Ca urmare, diferitele culori componente nu ajung în același focar și de aceea nu se poate combina pentru a forma culoarea albă. Ca rezultat, imaginea este difuză, în culori, iar conturul apare confuz.

Aceste defecte au fost corectate prin construirea și utilizarea obiectivelor speciale, *acromatice, apocromatice,* formate din mai multe lentile.

După gradul de corectare al aberațiilor se disting următoarele tipuri de obiective : (Fig. 26)

a. *Obiective acromatice,* cu ajutorul cărora se realizează corecția aberațiilor cromatice pentru două radiații ale spectrului vizibil (galben sau verde-albastru), dar numai pentru zona centrală a obiectivului.

Obiectivele acromatice uscate cu apertură maximă de 0,85 dau rezultate bune la măriri slabe, dar nu dau rezultate cînd măririle proprii ale obiectivelor depășesc 60 X.

Sînt practice obiectivele acromatice cu apertură de 1,25 cu imersie în apă distilată. Obiectivele acromatice prezintă fenomene de curbură foarte supărătoare pentru observații. Pentru eliminarea acestor defecțiuni este necesar să se pună la punct microscopul succesiv pentru fie-

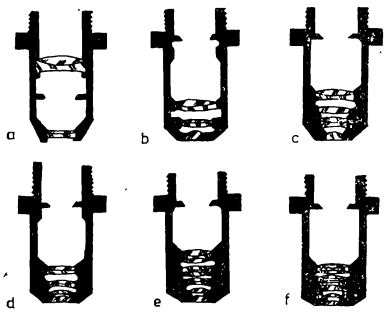


Fig. 26 — Tipuri de obiective : a — acromat nr. 2 (6—8x) ; b — acromat nr. 6 (40—45x) ; c — semiapocromat ; d — acromat cu imersie ; e — apocromat cu imersie, apertura 1,40 ; f — apocromat cu imersie, 120 X, apertura 1.30.

care zonă, de la centru spre periferie. Acest fenomen este mai accentuat la obiectivele cu imersie.

b. *Obiectivele semiaprocromatice*. Aceste obiective permit o corecție bună a aberațiilor cromatice și dau o imagine foarte luminoasă. Cele mai bune au apertura egală cu 1,32, suportînd măriri totale pînă la 1500 X.

c. *Obiective apocromatice*. Acest obiective dau imagini luminoase. Aberația de sfericitate nefiind corectată aici, obiectivul apocromatic se folosește în mod obligatoriu cu un ocular compensator avînd aceeași aberație, însă de sens invers. De asemenea, este importantă și curbura cîmpului. Totuși aceste obiective dau rezultate bune în microfotografiere.

d. *Obiective monocromatice* — Acestea sînt obiective confecționate din cuarț. Ele sînt folosite în cazul microfotografierii în raze ultraviolete.

Obiectivele monocromatice cu imersie folosesc drept lichid un amestec de apă distilată și glicerină. Lucrînd în ultraviolet au o mare putere de rezoluție.

e. *Obiective panacromatice* — Aceste obiective sînt avantajoase în cazul cîmpurilor plane. Se folosesc numai pentru cercetarea secțiunilor subțiri.

f. *Obiective pentru contrast de fază* — Obiectivele de acest fel sînt sisteme acromatice sau semiacromatice prevăzute cu o lamă sfert de undă, prezentînd un inel defazant și absorbant. Oricare ar fi tipul de obiectiv utilizat, menirea sa în sistemul optic al microscopului este de a da o imagine mult mărită, reală și răsturnată a obiectivului (preparatului), punînd în evidență detalii structurale inaccesibile pentru ochiul omului.

2. *Ocularul* — este o parte componentă a sistemului optic al microscopului care servește la mărirea imaginii dată de obiectiv fără să pună în evidență detalii de structură, el transformînd imaginea reală într-o imagine virtuală.

El este alcătuit din două lentile plan-convexe fixate într-un cilindru metalic, care este introdus în partea superioară a tubului microscopic.

Fiecare ocular este notat cu un număr (2 X, 7 X, 10 X, 15 X, 20 X, 25 X, 30 X) care indică puterea de mărire a fiecăruia. Se cunosc pînă în prezent 5 tipuri de oculare (Fig. 27) :

Fig. 27 — Tipuri de oculare : a — ocular negativ Huygens ; b — ocular negativ acromatic (periplan, plancromatic) ; c — ocular pozitiv ortoscopic (de cîmp mare) ; d — ocular tip Kellner (micrometric) ; e — ocular fotografic (proiectiv) cu reglare.

1. *Oculare Huyghens,* întrebuințate în mod curent și care sînt compuse din două lentile plan-convexe (o lentilă de ochi și una de cîmp, cu fețele plane în sus și separate de un ecran inelar).

Puterea lor de mărire variază între 4 și 12 X. Acestea se asociază de obicei cu obiectivele acromatice.

2. *Oculare compensatoare* — sînt astfel construite încît dău măriri mai mari pentru lumina roșie decît pentru lumina violetă, în scopul de a compensa defectul pe care-l au obiectivele apocromatice puternice.

Drept semn distinctiv poartă gravată pe montura lor litera „K" sau se scrie în întregime „ocular compensator". Aceste oculare le utilizăm decît în cazul obiectivelor apocromatice și semiapocromatice.

3. *Ocularele periplane și semiacromatice.* Acestea sînt veritabile oculare universale.

4. *Ocularele ortoscopice* — sînt destinate pentru a corecta acromatele de măriri mici și medii.

5. *Ocularele proiective (foto-oculare)* — sînt oculare speciale pentru microfotografiere, a căror denumire variază după fabricație, oculare homale, periplanmetrice, complanmetrice, foto-oculare etc.

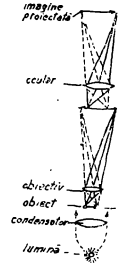
Formarea imaginii și puterea de mărire a microscopului

Imaginea formată de microscopul fotonic, este o imagine de interferință între razele directe și cele difractate de obiect (preparat).

Obiectivul dă în partea superioară a tubului microscopului, o imagine reală, răsturnată și mărită a obiectului.

Ocularul care acționează ca o lupă, preia această imagine și o transformă într-o imagine virtuală, dreaptă și mărită în raport cu prima

imagine. În felul acesta imaginea finală dată de microscopul fotonic este virtuală, răsturnată și mult mărită în raport cu obiectul (Fig. 28 a).



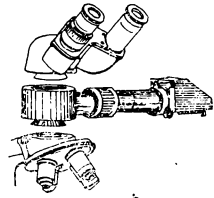


Fig. 28 — Formarea imaginii la microscopul optic (a) și camera clară (b).

Noțiuni elementare de optică microscopică

Fiecare care lucrează în domeniul microscopiei optice trebuie să cunoască o serie de noțiuni elementare de optică care sînt reprezentate prin :

A. Puterea de mărire a microscopului ;
B. Grosismentul microscopului ;
C. Apertura numerică ;
D. Puterea de rezoluție (separatoare) ;
E. Profunzimea imaginii ;
F. Distanța frontală ;

A. *Puterea de mărire a microscopului* — depinde de lungimea focală a obiectivului, de puterea de mărire a ocularului și de distanța dintre sistemul de lentile al obiectivului și imaginea produsă, adică de lungimea optică a tubului.

Practic vorbind, mărimea totală a unei imagini de către microscop (K), poate fi variată prin schimbarea obiectivelor și a ocularelor. Ea este dată de produsul dintre puterea de mărire a obiectivului (n. ob.) și puterea de mărire a ocularului (n. oc.) (vezi Tabelul 1).

$$K = \text{n. ob.} \times \text{n. oc.}$$

Tabelul 1

Puterea de mărire a microscopului

Ocular	Obiective				
	10 x	20 x	40 x	90 x	120 x
7 x	70	140	280	630	840
10 x	100	200	400	900	1200
15 x	150	300	600	1350	1800
20 x	200	400	800	1800	2400
30 x	300	600	1200	2700	3600

B. *Grosismentul microscopului* — se calculează stabilind raportul care există între diametrul obiectului de studiat și diametrul imaginii microscopului, la distanța minimă a vederii normale care este de 25 cm.

Se cunosc trei procedee pentru determinarea grosismentului unui microscop :

a. *Cu camera clară.*

Pentru folosirea acestui procedeu avem nevoie de o cameră clară (Fig. 28 b) și un micrometru obiectiv, cu care lucrăm în felul următor : punem la punct micrometrul obiectiv, atașăm camera clară la obiectiv și desenăm pe o hîrtie cîteva diviziuni ale micrometrului obiectiv. Desenul obținut reprezintă sutimile de milimetru ale micrometrului obiectiv, mărite de combinarea ocularo-obiectivă întrebuințată la microscopul nostru. Apoi facem raportul între mărimea intervalului cuprins între două diviziuni vecine desenate și o sutime de milimetru, și obținem grosismentul microscopului. Exemplu : presupunem că intervalul dintre două diviziuni de pe desen măsurate cu compasul este de 2 mm, vom avea deci :

$$2 : \frac{1}{100} = \frac{-2 \times 100}{1} = \frac{200}{1} = 200 \text{ ori.}$$

Deci grosismentul microscopului în cazul de față este de 200 ori.

b. *Procedeul dublei vederi.*

În acest procedeu folosim numai un micrometru obiectiv și lucrăm astfel : punem la punct micrometrul obiectiv și ne uităm la el prin microscop cu ochiul stîng ; în același timp privim cu ochiul drept vîrfurile unui compas deschis pe care-l ținem cu mîna dreaptă deasupra unei foi de hîrtie, așezată lîngă microscop. Deși, fiecare ochi observă două obiecte deosebite, micrometrul și compasul, cele două imagini se suprapun în centrul vizual cortical, încît lucrurile se petrec ca și cum am putea realmente măsura cu compasul diviziunile micrometrice mărite la microscop. Dacă vîrfurile compasului cu care măsurăm intervalul dintre două diviziuni sînt îndepărtate la 2 mm, folosind același calcul ca în procedeul anterior, obținem grosismentul microscopului egal cu 200.

c. *Cu ajutorul celor două micrometre* (Fig. 29, 30).

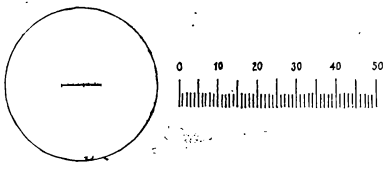
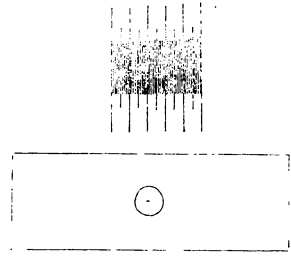


Fig. 29 — Micrometrul ocular.

Fig. 30 — Micrometrul obiectiv.



Așezăm micrometrul ocular, punem la punct micrometrul obiectiv și ne uităm să vedem cîte diviziuni ale micrometrului ocular corespund unei diviziuni micrometrice obiective. Să presupunem că trei diviziuni oculare, adică 3 mm, sînt egale cu o diviziune obiectivă $\left(\frac{1}{100}\text{ de mm}\right)$ vom avea atunci :

$$\frac{1}{100} \times 3 = \frac{300}{1} = 300 \text{ de diametre.}$$

C. *Apertura numerică* — a fost definită de către ABBE ca fiind sinusul jumătății unghiului de deschidere a obiectivului.

$$\text{A.N.} = n \sin \alpha$$

n — reprezintă indicele de refracție al lichidului de imersie utilizat care este de 1,51 la uleiul de cedru, 1,47 la uleiul de parafină, 1,48 la uleiul de ricin ; iar $\alpha = \frac{\text{apertura unghiulară}}{2}$

D. *Puterea de rezoluție (separatoare).* Numărul detaliilor de structură și precizia cu care pot fi evidențiate într-un obiect, depind de puterea de rezolvare sau de separare a sistemului optic (ochi, microscop), cu care sînt examinate, adică de capacitatea acestuia de a da imagini distincte a două puncte adiacente.

Puterea de rezoluție nu trebuie confundată cu vizibilitatea, deoarece un obiect poate fi vizibil fără să i se vadă detaliile de structură.

Puterea de rezoluție sau de separare a unui sistem optic este reprezentată de cea mai mică distanță la care două particule sau linii separate pot fi văzute individualizat, adică formînd imagini distincte pentru ochi sau placa fotografică. Această distanță (d) este calculată de raportul dintre lungimea de undă a razelor luminoase folosite (λ) și constanta n sin α, care reprezintă apertura numerică a obiectivului folosit.

În această constantă, n — reprezintă indicele de refracție al mediului dintre obiect și lentila obiectiv, iar $\lambda = 1/2$ din apertura unghiulară a obiectivului : $d = \frac{n \sin \alpha}{\lambda}$

De exemplu, admițînd că lungimea de undă medie a luminii albe este de 5500Å (0,55 microni), cel mai mic detaliu de structură care poate fi deosebit la această lumină cu obiectivul 40 (A.N. = 0,65), este $\frac{0,55}{0,55}$ microni = 0,85 microni.

microni = 0,85 microni. Puterea de rezoluție a unui obiectiv poate fi îmbunătățită prin :

— mărimea unghiului de deschidere pînă la 143° (apertura numerică 0,95). Pentru $\lambda = 0,55$ μ, puterea de rezoluție a unui astfel de obiectiv atinge 3000 linii pe milimetru ;

— mărirea indicelui de refracție al mediului de imersie (n = 1,66), la apertura 1,60, puterea de rezoluție atinge 6000 linii pe milimetru pentru $\lambda = 0,55$ μ.

— folosirea unei lumini cu o lungime de undă mică. Utilizarea obiectivului monocromatic Zeiss cu apertura 1,25 în lumina ultravioletă ($\lambda = 0,275$ μ), permite atingerea unei puteri de rezoluție de 9000 trăsături pe milimetru.

E. *Profunzimea imaginii*. De puterea de mărire a microscopului și de apertura obiectivului (cifra gravată pe obiectiv — 40,60), depinde profunzimea clarității imaginii (T). Fiecare obiectiv ne permite să vedem preparatul la o anumită profunzime într-un punct.

Profunzimea clarității imaginii este determinată după formula :

$$T = \frac{1000}{7\,AV} + \frac{\lambda}{2\,A^2}$$

În cazul puterii de mărire, V = 1350, apertura 1,3, lungimea de undă $\lambda = 0,55$, profunzimea clarității T = 0,24μ.

Tabelul 2

Calculul profunzimii imaginii

Profunzimea — mm	Grosimentul	Aparatura
1/10 mm	20 x	0,10
1/100 mm	75 x	0,23
1/1000 mm	250 x	0,65
1/10.000 mm	1200 x	1,25

Calculele arată că mărirea utilă a unui microscop fotonic nu poate depăși 1300—1450 x, ea fiind egală cu 1000 Å. O mărire mai accentuată nu evidențiază detalii noi pe imagine, iar iluminarea ei devine mai slabă.

F. *Distanța frontală* — reprezintă lungimea dintre fața lentilei frontale a obiectivului și fața superioară a lamelei ce acoperă preparatul supus observării. Unei distanțe focale scurte îi corespunde o dis-

tanță frontală mică, apertura fiind mai mare. Distanțele frontale sînt calculate în general pentru lamelele de 0,17 mm grosime. În mod obligatoriu se vor folosi lamele foarte subțiri la obiective cu imersie foarte puternice, care au ele însile distanțe frontale de 0,05—0,008 mm.

Imaginea dată de obiectivul de imersie sete foarte sensibilă la variații de grosime ale lentilei.

Fiecare obiectiv puternic este prevăzut pentru corecție, în cazul variației grosimii lamelelor, cu un ansamblu de lentile care se deplasează prin manevrarea unui inel corector gradat, montat pe tubul obiectivului. Diviziunile inelului corespund cu grosimea lamelei.

4.2. ÎNTREȚINEREA MICROSCOPULUI

Microscopul trebuie ținut departe de căldură sau de umezeală. El nu trebuie trîntit, lovit sau udat cu diverse lichide. Nu trebuie, pe cît este posibil să fie mutat prea des de pe o masă pe alta. Cînd este transportat la o distanță prea mare trebuie pus în cutia lui și fixat cu șurubul de siguranță, pentru ca în timpul transportului să nu se miște în cutie.

Microscopul trebuie ferit de praf, de aceea cît timp este scos din cutie și nu este folosit, se ține sub un clopot de sticlă sau din alt material (ex. pungi de material plastic). Nu se va lăsa tubul fără ocular, pentru că în această situație praful pătrunde prin tub în obiectiv. După întrebuințare, microscopul va fi pus în cutia lui și închis. Înainte de a fi pus în cutie, revolverul va fi întors în așa fel încît în dreptul platinei să se afle obiectivul cu cea mai mică putere măritoare, iar tubul va fi lăsat în jos, manevrînd viza macrometrică, atît cît permite aceasta.

Microscopul se șterge de praf cu o cîrpă moale de flanelă, fără seame, de preferință cu o piele de căprioară.

În caz de defectare, microscopul trebuie reparat numai de specialiști.

4.3. FUNCȚIONAREA MICROSCOPULUI

Se ridică cu ajutorul vizei macrometrice tubul microscopului, apoi se fixează preparatul microscopic de platină, cu ajutorul celor doi cărcți sau cu sistemul de fixare situat pe dispozitivul numai „căruciorˮ.

Apoi cu atenție rotim viza macrometrică și coborîm tubul microscopului pînă cînd observăm imaginea clară a preparatului microscopic.

Prima observare se face cu obiectivul cel mai mic, apoi se rotește cu atenție revolverul aducînd pe axul microscopului obiectivul cel mai mare și îl apropiem cît mai mult de preparatul microscopic prin rotirea lentă, uniformă a vizei micrometrice, pînă cînd ne apare imaginea clară, mult mărită a obiectului de cercetat.

În cazul utilizării obiectivului cu imersie (90 X, 120 X), se adaugă pe lamelă 1—2 picături de ulei de cedru sau ulei de parafină, sau se pune direct pe preparat, în zona care trebuie observată (ex. la frotiuri), și apoi se apropie cu atenței obiectivul folosind viza micrometrică.

Imediat după examinare, obiectivul cu imersie se ridică cu ajutorul vizei macrometrice și se șterge cu pulpa degetului. Dacă obiectivul nu a fost șters la timp și uleiul s-a uscat, se curăță cu pulpa degetului sau cu o piele de căprioară umezită în cloroform.

Nu se va utiliza xilol sau benzen, pentru că se riscă dezlipirea lentilelor imersiunii, care sînt fixate cu substanțe solubile în aceste lichide.

Dacă uleiul de cedru s-a îngroșat sau s-a uscat se fluidifică adăugînd puțin xilol. Xilolul se utilizează la curățirea uleiului de cedru de pe platina și stativul microscopului, precum și la curățirea preparatelor microscopice după examinare cu imersie.

4.4. UTILIZAREA MICROSCOPULUI OPTIC SAU FOTONIC

Acest aparat optic este utilizat în scop didactic și științific, în studiile complexe de citologie, histologie, microbiologie, genetică, fiziologie, patologie, taxonomie; și se află în dotarea laboratoarelor din cadrul Institutelor de cercetări biologice, medicale și agricole, în cadrul laboratoarelor de specialitate a facultăților de biologie, medicină, farmacie, agronomie, geologie, precum și în întregul învățămînt general și liceal din țara noastră.

4.5. TIPURI DE MICROSCOAPE OPTICE ȘI FOTONICE

În laboratoarele noastre didactice și de cercetare, întîlnim numeroase tipuri de microscoape, unele de fabricație românească (I.O.R.), cum sînt: microscopul didactic — monocular; microscopul de laborator binocular tip M.L.-4, microscoapele de cercetare — MC-1, MC-2, MC-3 și MC-5, sînt microscoape universale la care se poate face o analiză diversă a preparatului: prin lumină directă (transmisă) reflectată și polarizată; cuprinzînd de asemenea echipamentul necesar pentru fluorescență, ultramicroscopie, contrast de fază, cu ultraviolete, de fotografiere și de proiecție. Sistemul de fotografiere și tehnica efectuării microfotografiilor vor fi explicate la capitolul „Aparatura de microfotografiere".

Dintre **microscoapele de fabricație străină amintim**: Microfotul D.16.B(ROW), Microscopul monocular-Zeiss, microscopul MBR-1 și MBR-2 din U.R.S.S. care posedă o serie de accesorii ca: obiectiv-micrometru, ocular-micrometru, aparat pentru desen, micromanipulator, instalații pentru microfotografii, microproiecții și filmare cu 9 filtre, microscopul de laborator — Neopan (Fig. 12), Ortopan-Reichert — Austria, Micro- și Macro-Promer — Leitz-Austria.

4.6. APARATURĂ FOTOGRAFICĂ ȘI MATERIALELE NECESARE

Pentru efectuarea microfotografiilor în afară de microscopul optic sau fotonic mai avem nevoie de:

— un laborator fotografic adecvat;

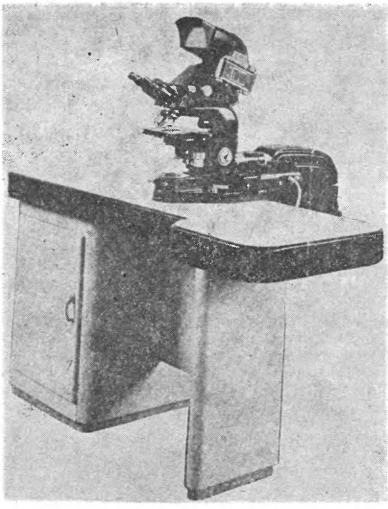


Fig. 31 — Microscopul de cercetare MC-1-IOR, fără instalație electrică și tablou de comandă.

— aparatura specială și dispozitive de microfotografiere ;
— materiale și ustensile necesare laboratorului fotografic.

4.6.1. LABORATORUL FOTOGRAFIC

Reprezintă o cameră de lucru care trebuie să îndeplinească o serie de condiții. Ea va fi aleasă, încît să fie lipsită de vibrațiile cauzate, fie pe umblatul pe podea, trîntitul ușilor, etc., fie de o masă de lucru șubredă.

De asemenea încăperea trebuie să fie ferită de praf și în ea să se poată crea un întuneric deplin. În încăpere nu trebuie să pătrundă vapori de apă, gaze, etc. a căror prezență poate deteriora aparatura și materialele fotografice.

Lîngă laboratorul fotografic trebuie să existe o altă încăpere mai mică (2,5 × 2 m este suficient), în care de asemenea să se poată asigura un întuneric deplin. În această cameră prevăzută cu apă curgătoare și instalație electrică, se vor prelucra filmele fotografice, obținute în laboratorul de microscopie.

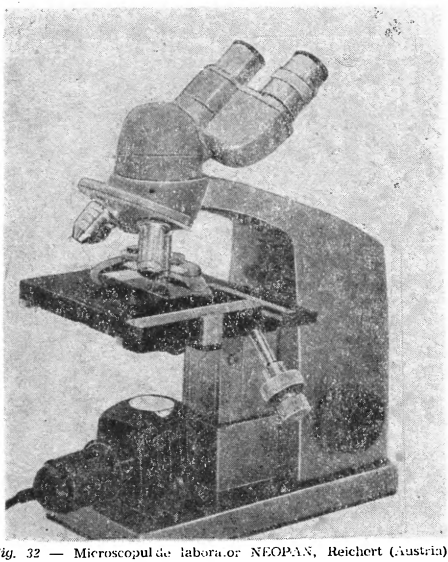


Fig. 32 — Microscopul de laborator NEOPAN, Reichert (Austria).

Laboratorul fotografic trebuie să cuprindă două categorii de utilaje :

a. *Utilaje necesare prelucrării materialului negativ* (Fig. 33) reprezentate de : *lămpi de laborator,* agățate pe perete care trebuie să prezinte filtre roșu-rubinii pentru filmele izocrome, și filtrele verzi-închis pentru filmele pancromatice de 18 DIN, eventual 22° DIN ; filtrele *galben-verzui,* tip Agfa 113 D, pentru hîrtia fotografică ; *tancurile de developare,* cu spirală și cu bandă Corex ; *cleme* pentru agățarea filmelor sau clișeelor ; *dulapuri de uscare* cu aer cald, sau cu uscător Föhn ; *rastele de lemn* în formă de X pentru uscarea plăcilor fotografice.

b. *Utilaje necesare prelucrării materialului pozitiv* (Fig. 34) *reprezentate de : aparatul de copiat* și *rama de copiat,* folosite pentru copierea negativelor ; *aparatul de mărit,* care poate fi : cu lumină dirijată, cu lumină difuză, cu lumină combinată (după sursa de lumină) și cu punere la punct a imaginei : manuală, semiautomată, automată și universale — la care se pot mări clișeele de la formatul 24/36 mm, pînă la 6/9 cm ; *rame încadratoare,* de format variabil, care sînt fabricate pentru trei

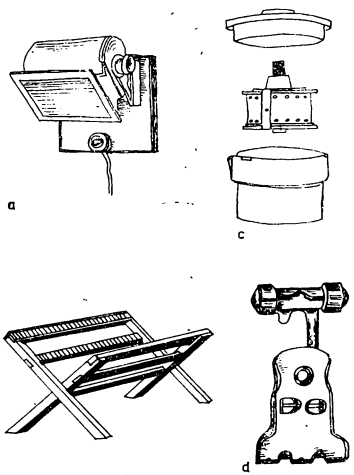


Fig. 33 — Ustensile de laborator foto: a — lampă de laborator; b — rastel pentru uscat plăci fotografice; c — tanc de developat Triplex; d — clemă.

dimensiuni maxime și anume: 18/24 cm, 23/30 cm sau 30/40 cm; *cuve* sau *tăvi de developare*, confecționate din tablă smălțuită, fie din material plastic, de dimensiuni cuprinse între 6/9 și 50/60 cm; *clești* de material plastic și metal inoxidabil necesari pentru manevrarea hîrtiilor; *uscător electric* și *rulouri* din cauciuc pentru uscarea și presarea fotografiilor pe placa cromată; tăietoare cu cuțit rotativ sau foarfece tip ghilotină; *ceasuri de expunere* și *ceasuri cronometru* cu sonerie de la 0′ la 60′; *frigider electric* pentru păstrarea filmelor și plăcilor ultrasensibile și sensibile în infraroșu.

Sticlăria va cuprinde: cilindrii gradați de 250 și 500 cm^3, eprubete gradate de 100 și 250 cm^3, pipete de 10 cm^3, flacoane de 150, 500 și 1000 cm^3 pentru revelatori cu formula uzuală, și de 1 l și 2 l, pentru soluții separate și pentru fixator.

Mai este necesară și o *balanță tehnică*, pentru greutăți pînă la 500 gr cu trusa respectivă.

4.6.2. APARATURA DE MICROFOTOGRAFIERE

Tehnica de lucru în vederea obținerii unor fotografii la microscop a preparatelor biologice sînt variate, în funcție de aparatele utilizate.

Pentru obținerea microfotografiilor se folosesc *microscoape moderne de cercetare*, care sînt prevăzute din construcție cu sisteme și anexe

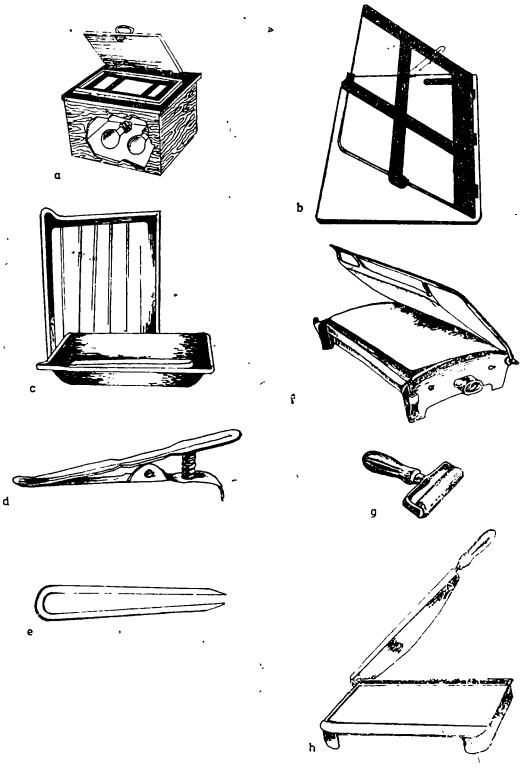


Fig. 34 — Utilaje din dotarea laboratorului foto : a. aparat de copiat filme ; b. ramă încadratoare de format variabil ; c. tăvi de developare ; d. cleşte de material inoxidabil ; e. cleşte de material plastic ; f. uscător electric ; g. rulou de cauciuc ; h. foarfecă cu cuţit rotativ.

pentru fotografierea prearatelor biologice, așa cum sînt : MC-1, MC-5 și Microfotul D.16.B (ROW) care le vom descrie amănunțit și *dispozitive* (tuburi intermediare microscopice), camere verticale, care se pot atașa la orice tip de microscop, utilizîndu-se orice aparat fotografic de format mic.

4.6.2.1. Microfotografierea la microscopul universal de cercetare MC-1

Microscopul universal de cercetare MC-1 (Fig. 31), produs de Întreprinderea Optică Română, reprezintă împreună cu microscopul MC-5, cel mai modern și perfecționat tip de microscop românesc, la care se poate face o analiză diversă și detaliată a preparatelor biologice prin : lumină directă (transmis), reflectată și polarizată, contrast de fază, fluorescență, cîmp întunecat, prezentînd și un sistem complex pentru fotografiere și proiecție. Prin urmare în cadrul acestui microscop se găsesc incluse toate tipurile de microscoape (fotonic, în cîmp întunecat, cu contrast de fază, în lumină polarizată, în lumină fluorescentă, în infraroșu), excepțînd cel electronic.

Sistemul complex de fotografiere permite fotografierea alb-negru și color a preparatelor biologice.

Microscopul universal MC-1, este construit pentru un domeniu larg de cercetare, folosind metode variate de observare, avînd în același timp posibilități de fotografiere și proiectare a imaginii proiectate.

Microscopul poate fi folosit cu succes în cercetări din domeniul biologiei, biochimiei, fiziologiei, citologiei, histologiei, geneticii, metalografiei, mineralogiei, etc.

Metodele de cercetare și posibilitățile microscopului universal MC-1 sînt :

1. Observarea în lumină transmisă direct sau oblică, cu optică monoculară sau binoculară, folosind diverse tipuri de obiective : *acromate* de 3 X, 6X, 10 X, 20X, 40 X, 90 X, *apocromate* de 40 X (cu corecție pentru grosimea lamelei), 60 X, și 90 X ; *oculare* de tpiul *Huygens* de 5X, 7 X, 10 X, 15 X, *compensatoare* de : 5 X, 7 X, 10 X, 15 X și un condensor cu apertură maximă 1,4.

2. Observarea în cîmp întunecat, folosind 4 tipuri de condensori pentru cîmp întunecat ;

3. Contrast de fază avînd obiectivele de 10 X, 20 X, 40 X, 90 X ;

4. Lumină polarizată cu polaroizi ;

5. Dispozitiv pentru fluoroscopie, prezentînd un set complet de filtre și lampa cu vapori de mercur, avînd o putere electrică de 200 W ;

6. Dispozitive pentru iluminare prin reflexie și combinat reflexie-transmisie, prezentînd obiective speciale de 7 X, 14 X, 22 X, 45 X.

Microscopul mai este prevăzut cu patru locașuri pentru patru surse de iluminare diferite, dintre care una pentru iluminare prin reflexie. În aceste locașuri se introduc 2 lămpi cu incandescență de 6 V, 30 W, 1 lampă cu vapori de mercur de 200 W, 1 lampă cu arc electric de 500 W. Ele pot fi introduse în sistemul optic al microscopului prin simpla comutare a unui comutator optic.

- Microscopul MC-1, mai este prevăzut cu un dispozitiv cu comutator optic, care permite dirijarea razelor care formează imaginea în cinci direcții diferite, pentru fotografiere sau proiecție după cum urmează :

— fotografierea monocromă pe film de 35 mm ;
— fotografierea color pe film de 35 mm ;
— filmarea obiectului cercetat pe film de 16 mm sau 35 mm ;
— fotografierea pe plăci 6 × 9 ;
— proiecția pe ecran dreptunghiular cu diagonala de 15 cm ;
— proiecție pe masă pentru desen ;
— proiecție pe ecran avînd diametrul de 1 m ;
— măsurarea fluxului luminos se face cu fotocelulă, în vederea stabilirii timpului de expunere.

Pentru fotografiere, vizarea se face prin dispozitivul binocular al microscopului sau privind în dispozitivele de vizare ale aparatelor foto pe care le utilizăm.

Pentru realizarea microfotografiilor trebuiesc efectuate o serie de manevre a căror succesiune este următoarea :

— Intr-o cameră obscură se încarcă cele două aparate Exacta Varex cu film de 35 mm, sau a casetelor cu plăci fotografice de 6 × 9 cm. Casetele se numerotează și se notează cu sensibilitatea plăcilor cu care au fost încărcate. Ambele aparate pot fi încărcate cu același tip de film sau diferite din punct de vedere al culorii sau sensibilității.

Alegerea filmului este determinată de scopul cercetării. Pentru microfotografii de preparate cu contraste mari se vor folosi filme și plăci cu sensibilitate mai mare (15, 17, 21 DIN), iar pentru preparatele lipsite de contrast sînt recomandate materiale cu sensibilitate mică (7,10 DIN). La alegrea materialelor fotosensibile se va ține cont de următorii factori : sensibilitatea la lumină generală, sensibilizarea cromatică (spectrală) și de compoziția spectrală a surselor de lumină folosite la microfotografiere.

— Aparatele încărcate se montează pe microscop în poziția de fotografiere, cu vizoarele deschise, îndreptate spre operator nu înainte însă de introducerea în locașul lor a ocularelor speciale, foto I sau foto II, după caz și scop.

— La fiecare aparat se montează cablul declanșator flexibil.

— Se vizează prin binocular. Ocularul cu reticul de încadrare (x—RI.) se așează la diviziunea zero. Se privește reticulul de încadrare și în caz de neclaritate a acestuia se reface reglajul prin rotirea lentilei ocularului R.I.

— Pe platina microscopului se așează preparatul ; prin deplasarea acestuia pe verticală și orizontală se face punerea la punct și încadrarea în cîmpul microscopului a sectorului pe care-l dorim să-l fotografiem. Punerea la punct se face pentru ocularul cu reticul, iar celălalt ocular se reglează pînă cînd apare clară și imaginea în acesta. În acest moment toate locurile de fotografiere sînt în corespondență.

— Se trage de butonul de deasupra revolverului în afară pînă la capătul cursei.

— Se acționează asupra butonului din fața schimbătorului de proiecție a luminii pentru măsurarea intensității fluxului luminos, în funcție

de intensitatea indicată de exponometru de fotografiere. Reglarea timpului de expunere se face în funcție de indicațiile exponometrului și de sensibilitatea filmului sau a plăcii fotografice.

— După reglarea timpului de expunere se acționează din nou asupra butonului din fața schimbătorului de proiecție a luminii pentru scoaterea din sistemul optic a exponometrului. Dacă toate manevrele au fost corect executate imaginea preparatului trebuie să apară pe geamul mat al aparatului fotografic.

— Se deschide capacul lateral al aparatului fotografic și se privește prin geamul mat. Dacă imaginea este bine centrată se poate trece la fotografierea propriu-zisă. Se armează aparatul prin declanșarea automată a timpilor lungi de expunere, manevrarea pîrghiei de armare spre stînga pînă la refuz, după care se armează dispozitivul.

În această situație aparatul este pregătit pentru a înregistra imaginea preparatului de pe lamă.

— Declanșarea se face numai cu declanșatorul flexibil după o prealabilă verificare a clarității imaginii care se poate face fie prin intermediul lupelor din vizoarele aparatelor foto, fie privind prin ocularele microscopului.

După terminarea tuturor imaginilor, filmul se trage din nou în casetă, se scoate din aparat și este supus prelucrării.

4.6.2.2. Microfografierea cu Microscopul D.16 B (ROW)

Microscopul de cercetare D.16.B (ROW), fabricat în R.D.G., este prevăzut cu un sistem de micro-fotografiere.

Înainte de a trece la executarea microfotografiilor trebuiesc executate următoarele operații :

— În susținătorul special, fixat lateral pe stativul înclinat al microscopului se introduce ocularul ; scoaterea ca și introducerea acestuia din lăcașul său se face prin apăsarea simultană asupra celor două manete.

— Se montează filmul în casetă. Caseta se scoate din lăcașul său împreună cu casca de protecție prin rotirea roții de fixare spre stînga. Pe lagărul superior se fixează caseta plină, iar pe cel inferior, aflat în legătură cu butonul de tracțiune, caseta goală. Filmul se trage pe sub fereasta casetei dintr-o parte în cealaltă apăsînd cu degetul mare pe lama din spatele ferestrei. Trebuie acordată multă atenție montării filmului în casetă, în sensul că în orificiile laterale ale acestuia să intre perfect roțile dințate de tracțiune ale casetei, deoarece orice imperfecțiune duce la ruperea filmului. Caseta astfel pregătită, se acoperă cu carcasa de protecție și se introduce în lăcașul de stativ. Se rotește spre dreapta discul de fixare pînă cînd caseta este perfect imobilizată. Prin rotirea butonului de tracțiune, fixat lateral pe casetă, se trag în caseta goală primele două poziții fiind voalate.

În lăcașul special, situat lateral pe stativul microscopului, între caseta ocular și dispozitivul de expunere, se fixează firul declanșator.

Microscopul astfel pregătit se poate trece la executarea microfotografiilor, efectuînd numeroase operații în ordinea indicată mai jus :

a. Se fixează în cîmpul microscopului sectorul de preparat care corespunde în cel mai înalt grad scopului urmărit. Sectorul ales trebuie să fie clar, structurile sale fiind în acelaşi plan vizual, uniform şi intens luminat.

b. Ocularele se rotesc cu 180°C.

c. Se priveşte prin ocularul situat sub dispozitivul de fixare a ocularelor iar prin manevre adecvate se încadrează structura ce urmează a fi fotografiată în dreptunghiul trasat pe lentila frontală a ocularului. Se roteşte ocularul într-un sens şi altul pînă cînd crucea din centrul ocularului se vede clar, formată din linii simple, nedublate. Dacă este necesar se mai face o corecţie a claritătii preparatului prin mişcarea vizei micrometrice.

d. Sistemul foto se armează prin ridicarea manetei situată lateral pe porţiunea înclinată a stativului în spatele dispozitivului de expunere.

e. Timpul de expunere se stabileşte prin fixarea manetei indicator la nivelul uneia din cifrele indicate pe disc. Dacă expunerea trebuie să fie mai mare de o secundă, maneta indicator se fixează în dreptul literei „B". În acest caz, pentru expunere este necesar a avea la dispoziţie un cronometru sau un ceas cu secundar.

f. Se apasă pe butonul firului declanşator, realizîndu-se expunerea filmului. Dacă timpul de expunere depăşeşte o secundă, se ţine în această poziţie pînă la scurgerea integrală a timpului stabilit anterior.

g. După expunere, filmul se rulează în casetă. Pentru aceasta se procedează astfel : se apasă în direcţie perpendiculară pe butonul de rularea filmului şi se roteşte puţin spre dreapta, fără a se mai apăsa pe buton ; se continuă rotirea pînă cînd se aude o uşoară pocnitură, ceeace indică întrarea în funcţie a piedicii.

4.6.2.3. Microfotografierea cu ajutorul tubului foto

Pentru obţinerea microfotografiilor, cele mai comode dispozitive care se găsesc în accesoriile microscoapelor de cercetare MC-1, MC-2, MC-3, sînt *tuburile intermediare foto* şi *dispozitivul Miflex* (fabricaţie Zeiss) (Fig. 35, a, b), care se pot adapta la oricare tip de microscop, şi la care putem să ataşăm oricare aparat fotografic de format mic (Extra Warex, Leica, Kontax, Kiev etc.).

Dispozitivele Miflex pot fi simple sau cu vizare laterală, prezentînd lateral un ocular telescopic, iar în partea superioară o cameră obscură (Fig. 36, a, b).

Pentru obţinerea microfotografiilor la oricare microscop, ataşîndu-se fie tubul intermediar foto sau dispozitivul Miflex se efectuează o serie de operaţii în următoarea succesiune :

a. Şurubul care fixează tubul microscopului de stativ se slăbeşte prin deşurubare şi astfel este posibilă îndepărtarea tubului împreună cu ocularele. Tubul odată scos, imediat se ambalează şi se depozitează într-un loc ferit de praf (recomandabil este aranajrea lui în lăcaşul special al lăzii în care a fost ambalat microscopul).

b. În locul tubului microscopic se montează tubul foto sau dispozitivul Miflex, prin strîngerea şurubului anterior slăbit.

c. În capătul superior liber al tubului foto sau miflexului se introduce unul din ocularele speciale pentru microfotografiere (foto I, foto II, proiective, foto-oculare etc.).

d. După o prealabilă verificare tehnică și încărcarea cu film, unul din aparatele fotografice, Extra Varex sau alt tip de aparat fotografic,

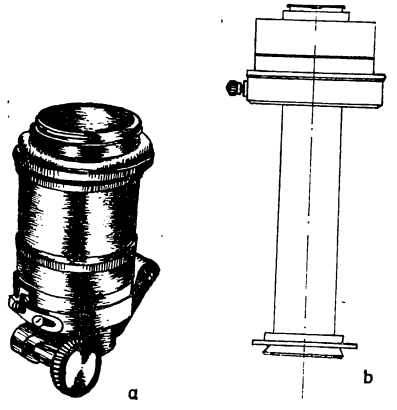


Fig. 35 — Tipuri de tuburi foto : a — tub intermediar foto ; b — dispozitivul Miflex.

se montează la capătul distal al tubului foto sau miflexului. La aparat se montează declanșatorul flexibil.

e. În funcție de intensitatea sursei luminoase, sensibilitatea filmului, transparența preparatului ș.a. se stabilește tipul de expunere, iar odată cu aceasta punerea în funcțiune a sistemului automat de deschidere și închidere a perdelei.

Prin deschiderea capacului lateral, imaginea preparatului de pe platina microscopului, trebuie să ne apară pe geamul mat. Dacă situația o cere, prin manevre adecvate se face punerea la punct în sensul obținerii celei mai clare imagini și o încadrării acesteia în cîmpul optic al aparatului foto.

f. În acest moment se poate trece la executarea de microfotografii : se armează aparatul prin tragerea manetei pînă la capăt și se apasă pe declanșatorul flexibil. După fiecare imagine aparatul foto se armează din nou.

g. După terminarea tuturor imaginilor, filmul se trage în casetă și se scoate din nou din aparat după care este developat.

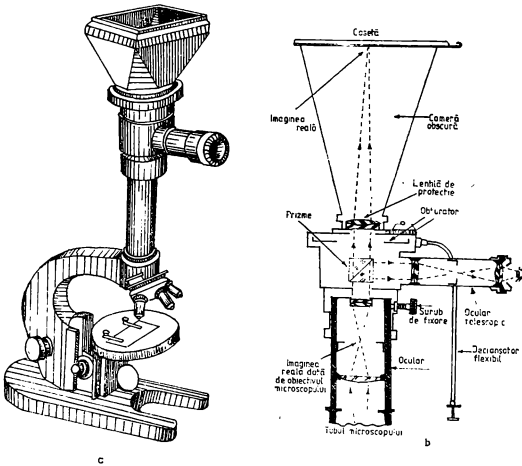


Fig. 36 — Microscopul de laborator la care s-a atașat dispozitivul Miflex cu vizare laterală (a) și schema optică a dispozitivului (b).

La dispozitivul Miflex, grosismentul nu poate fi variat, deoarece este dinainte stabilit prin constantele echipamentului. Dacă microfotografiile se execută cu un aparat fotografic de model mic, mărimea clișeului este :

$$G \text{ foto} = \frac{G \text{ tot.}}{2}$$

adică jumătate din grosismentul microscopului.

Dacă în locul ocularului microscopului se folosesc proiective, atunci grosismentul imaginii este dat de produsul dintre grosismentul obiectivului și grosismentul proiectivului, indicat pe montură.

4.6.2.4. Alte dispozitive pentru fotografierea la microscop

Camerele verticale (Fig. 37).

Acestea au o extindere variabilă, fiind cu burduf. Punerea la punct se face pe geam mat, iar obturatorul este fixat la partea inferioară. Plăcile fotografice folosite sînt de mărime medie sau mare (9 × 12 pînă la 13 × 18 cm).

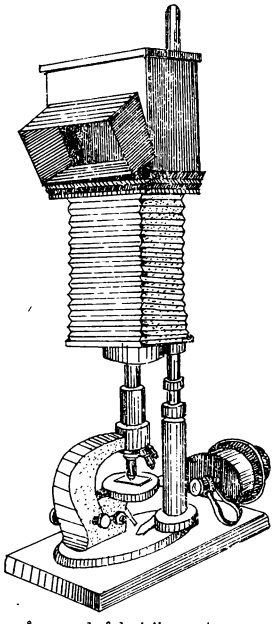


Fig. 37 — Camera verticală Zeiss montată la microscop.

În cazul folosirii acestor aparate la calculul grosismentului total obținut pe placa fotografică trebuie să se țină seama și de lungimea camerei (distanța T dintre placă și ocular), exprimată în milimetri :

$$G_{foto} = G_{vizual} \times \frac{T}{250}$$

Bancurile optice, servesc drept suport pentru camerele orizontale (Fig. 20), extinderea putînd atinge 2 m (formatele obișnuite ale plăcilor fotografice folosite cu aceste dispozitive sînt 13 × 18 și 18 × 24).

Microscopul însăși este așezat orizontal și stabilitatea este excelentă. Aceste camere sînt folosite în special în metalografie.

Un dispozitiv simplu pentru microfotografiere (Fig. 39). Nu fiecare laborator poate fi utilat cu dispozitive moderne și costisitoare pentru

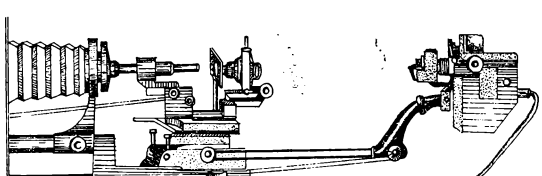


Fig. 38 — Cameră orizontală pentru microfotografiere

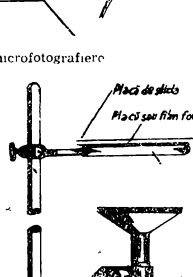


Fig. 39 — Instalație simplă pentru microfotografiere

efectuarea microfotografiilor. Oricine își poate construi însă, în laborator, cu mijloace modeste, un dispozitiv care, adaptat la microscop, poate fi folosit la obținerea unor microfotografii de foarte bună calitate.

Principiul se bazează pe proiectarea imaginii mărite direct pe hîrtia fotosensibilă sau pe placă, microscopul jucînd rolul unui proiector, iar filmul ce se proiectează fiind înlocuit în cazul de față cu preparatul microscopic care se fotografiază. În locul ocularului microscopului se așează în tubul microscopului o pîlnie confecționată din hîrtie neagră mată. Gulerul pîlniei protejează materialul fotosensibil împotriva iluminării laterale.

Lîngă microscop se montează un stativ pe care se fixează un inel cu mufă, pe acesta se așează un geam dintr-o sticlă de bună calitate (de

exemplu o placă fotografică, curățată de gelatină), iar pe aceasta se pune un geam mat cu partea mată spre microscop. Toată instalația se montează într-o cameră obscură.

Mărirea sau micșorarea se asigură deplasînd cercul în jos sau în sus.

Imaginea se observă pe geamul mat, reglîndu-se șurubul micrometric al microscopului, astfel încît să obținem o imagine cît mai clară.

Se stinge sistemul de iluminare și la lumina roșie se introduce sub geamul mat hîrtia sau placa fotografică. Se apasă cu o greutate, astfel încît hîrtia să adere perfect la suprafața geamului. Expunerea se efectuează prin aprinderea lămpii care iluminează oglinda microscopului, cînd produce impresionarea stratului de emulsie fotografică. Expunerea se face în așa fel încît să fie eliminată orice trepidație a sistemului.

4.7. SUBSTANȚE CHIMICE UTILIZATE ÎN LABORATORUL FOTOGRAFIC

Developanți: hidrochinonă, metanol, amidol.

Baze și săruri: carbonatul de sodiu anhidru, borax, amoniac, sodă caustică, potasă caustică.

Sulfiți: sulfit neutru de sodiu anhidru, sulfit acid sau bisulfit de sodiu, metabisulfit de potasiu cristalizat, hiposulfit de sodiu cristalizat

Diverse: Bromură de potasiu cristalizată, alaun de crom, alaun ordinar, clorură mercurică, sulfat de sodiu cristalizat, permanganat de potasiu, persulfat de amoniu.

Toate substanțele se păstrează în vase sau flacoane originale. Substanțele anhidre livrate în ambalaj de hîrtie trebuie trecute imediat în borcane de sticlă sau în cutii din metal inoxidabil, bine închise.

Este bine ca apa care se folosește la prepararea soluțiilor să fie distilată, iar temperatura ei să nu depășească 45°C. O apă prea „dură" (cu conținut mare de săruri de calciu) folosită în prepararea soluțiilor poate da lucrări necorespunzătoare. Revelatorii trebuiesc preparați respectînd ordinea de dizolvare arătată în rețetă. Nu se introduce nici o substanță nouă în soluție pînă ce nu s-a dizolvat complet substanța introdusă anterior. Este bine să se filtreze soluțiile finale obținute. Soluțiile se lasă liniștite cel puțin 24 ore. Nu se vor agita înainte de folosire.

Fixatorul nu trebuie preparat imediat înainte de folosire, pentru că dizolvarea hiposulfitului produce o scădere simțitoare a temperaturii, fapt pentru care prelungește timpul de fixare.

Toate sticlele se etichetează obligatoriu, iar etichetele vor fi parafinate. Etichetele se ung cu o soluție de parafină în eter.

Se vor evita dopurile de sticlă rodate, întrucît se înțepenesc în gîtul sticlei. Sticlele se pot astupa foarte bine cu dopuri de cauciuc parafinate. Revelatorii se păstrează numai în sticle brune, ferite de lumină și la o temperatură de maximum 20°C. Sticlele vor fi cît mai pline, pentru a avea o suprafață cît mai mică în contact cu aerul.

4.8. MICROFOTOGRAFIEREA

4.8.1. FACTORII FOTOGRAFICI

Microfotografia este un auxiliar prețios de cercetare în orice ramură științifică în care se folosește microscopul.

Executarea unei fotografii la microscop este înainte de toate, o problemă de *optică*, de *iluminare*, factorii geografici fiind de importanță secundară.

Obținerea unei bune microfotgorafii depinde de o serie întreagă de factori și anume :

a. o iluminare constantă ;
b. o bună poziție a filamentului în raport cu colectorul ;
c. o așezare la distanță corespunzătoare a condensorului de la microscop ;
d. folosirea unor sisteme optice corespunzătoare ;
e. folosirea unor filtre adecvate pentru microfotografii ;
f. fixarea timpului de expunere.

4.8.1.1. Sursa de lumină (iluminarea)

Nerespectarea indicațiilor privind iluminarea provoacă neajunsuri din cauza neuniformității de iluminare rezultate.

Pentru ca în microfotografiere să se folosească o iluminare cît mai potrivită, se recurge la sistemul de iluminare cunoscut în literatură sub denumirea de „iluminarea Kohler" (Fig. 40, A, B).

În acest scop se vor urma întru-totul indicațiile de mai jos :

— se așează aparatura pe o masă cu stabilitate perfectă, grea și cu o suprafață mată. Este bine ca suprafața mesei să fie acoperită cu o foaie de cauciuc ;

— nu se va instala microscopul în fața ferestrei. Încăperea se va alege astfel încît să se poată face întuneric deplin ;

— sursa de lumină trebuie să fie constituită dintr-o lampă pe care am prezentat-o anterior, prevăzută cu diafragmă iris și geam mat.

În timpul lucrului se va ține seama de următoarele observații :

— imaginea sursei trebuie să se formeze în planul preparatului ;

— suprafața iluminată nu trebuie să depășească întinderea cîmpului ce se studiază ;

— condensorul se diafragmează puțin, cu 1/5—1/4 din deschiderea totală.

Reglarea permite obținerea unui cîmp perfect iluminat dacă se procedează așa cum vor prezenta în continuare :

— se așează sursa luminoasă la 30 cm de oglindă ;

— se centrează imaginea filamentului lămpii în centrul oglinzii ;

— se reduce la jumătate deschiderea diafragmei lămpii ;

— se pune la punct imaginea filamentului lămpii, în mijlocul condensorului, închisă la maximum ;

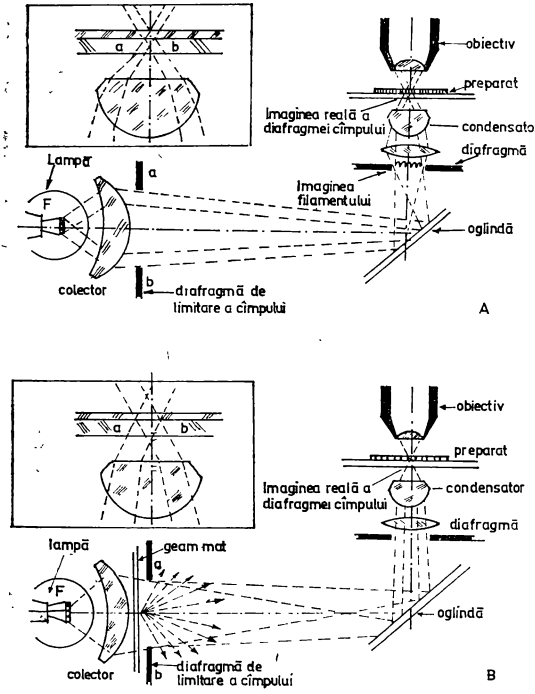


Fig. 40 — Schema iluminării în microfotografie : a, b — mersul razelor de lumină în iluminarea Kohler

— se dirijează raza de lumină pe axa optică a microscopului, potrivind înclinarea oglinzii ;

— se deschide diafragma lămpii ;

— se introduce geamul mat în fața lămpii ;

— se pune la punct microscopul pentru obținerea imaginii preparatului ;

— se reglează în așa fel condensorul microscopului încît imaginea sticlei mate din fața lămpii să se formeze în planul preparatului. O linie trasată cu creionul pe geamul mat ușurează acest reglaz ;

— se închide diafragma lămpii ;

— se centrează cercul luminos în cîmp prin orientarea oglinzii, privind în microscop ;

— se deschide diafragma lămpii ;

— se privește în microscop închizînd diafragma lămpii pînă cînd imaginea luminoasă coincide cu cîmpul microscopului ;

— se închide irisul condensorului cu 1/4 pînă la 1/5 din diametrul său. Pentru aceasta se scoate ocularul și se privește prin tubul microscopului. Lentila din spate a obiectivului va fi complet și uniform iluminată. Se închide treptat irisul, pînă cînd diametrul discului iluminat va fi redus la 3/4 pînă la 4/5 din valoarea inițială ;

— se reglează intensitatea luminii cu ajutorul reostatului lămpii sau interpunînd diferite filtre.

Dacă se respectă acaeste condiții de iluminare a preparatului la microfotografiere, se îndepărtează și lumina parazită, care provoacă multe neajunsuri.

4.8.2. ALEGEREA SISTEMULUI OPTIC

a. *Obiectivul*

În microfotogarfie se preferă folosirea unui obiectiv apocromat de bună calitate. Este bine să avem la îndemînă un număr suficient de obiective, pentru a ne permite o întreagă gamă de combinații. Astfel, se pot folosii ;

— *Obiective uscate* 6 x (0,15) ; 10 x (0,30) ; 20 x (0,65) ; 40 x (0,95). cu inel de corecție ;

— *Obiective cu imersie în ulei* — 60 x (1,0) ; 90 x (1,40) ; 120 x (1,30).

b. *Ocularul*

Ocularul ordinare (Huygens, periplan sau compensatoare) nu asigură obținerea unei bune imagini fotografice.

La aceste oculare claritatea în centru este bună, însă curbarea cîmpului este extrem de supărătoare, mai ales pentru preparatele microscopice de suprafață mare. Se pot totuși folosi combinațiile : oculare Huygens + acromatice slabe ; periplan + acromatice medii ; compensatoare + acromatice tari și apocromatice.

Cele mai folosite oculare speciale, calculate pentru microfotografii, sînt așa numitele Homals (Zeiss) sau Amphiplan (Bausch-Lömb). Acestea dau imagini foarte plane, astfel nu va mai apare curbura cîmpului. Sînt însă inutilizabile pentru observarea vizuală.

Acest tip de oculare speciale trebuiesc asociate cu obiective apocromatice, pentru că măresc, corijează și aplanează imaginea. Ocularele de proiecție (proiective) dau rezultate bune cu obiectivele acromatice slabe și mijlocii :

c. *Condensorul*

Condensorul Abbe cu două sau trei lentile nu este recomandabil, dînd o aberație mare. Dacă se lucrează în lumină monocromatică verde se pot folosi cu succes condensoarele amplasate cu apertura 1,40.

Cînd dorim să obținem puteri de rezoluție foarte mari, vom lucra cu un condesor acromatic cu imersiune (apertura 1,30 sau 1,40).

d. *Grosismentul*

După fiecare microfotografie, determinarea scării este deosebit de importantă. O microfotografie lipsită de scară nu are nici o valoare științifică. Se știe că grosismentul microscopului este produsul dintre mărirea proprie a obiectivului și grosismentul ocularului. Grosimentul total nu este însă identic cu scara fotografiei. Folosim relația :

$$G_{foto} = G \text{ microscopului} \times \frac{T}{250}$$

T = reprezentarea în milimetrii a camerei, respectiv distanța dintre ocularul microscopului și placa fotografică sau pelicula filmului. În cazul folosirii dispozitivului Miflex, T = 125 mm,, deci :

$$G_{foto} = M_{obiectiv} \times 0.5$$

În acest caz. folosind aceeași formulă, reiese clar că grosismul fotografiei crește în raport cu lungimea camerei la aceeași pereche ocular—obiectiv.

4.8.3. FILTRELE PENTRU MICROFOTOGRAFIERE

Pentru operațiile legate de microfotografiere, este necesară folosirea unei game întregi de filtre, pe care le indicăm în continuare :

— Filtre neutre ce reduc iluminarea obiectivului, fără modificarea culorii ;

— Filtre colorate solide și lichide care sînt folosite pentru modificarea culorilor preparatului ;

— Filtrele monocromatice care transmit o bandă specială limitată Acestea se folosesc în scopul de a se elimina spectrul secundar al obiectivelor acromatice și a se ameliora claritatea imaginii. Dăm ca exemplu folosirea filtrului verde, care izolează banda de 5461 Å.

— Filtrele infraroșii ce nu lasă să treacă decît lumina avînd lungimea de undă $\lambda = 0,7$ μ, permițînd fotografierea unor obiecte opace la lumină obișnuită.

— Ecranele antiultraviolet ce opresc radiațiile ultraviolete date de o lampă de cuarț, de exemplu, pentru protejarea microorganismelor vii.

— Ecranele anticalorice care opresc razele infraroșii. Ele se utilizează în special acolo unde trebuie protejate preparatele supuse unei iluminări prea intense.

Filtrele polarizate (polaroid) care sînt utilizate cîteodată în rolul nicolilor, pentru cercetări în lumină polarizată. Filtrele din sticlă sînt cele mai comode și mai practice.

Se mai utilizează filtre din *gelatină* și filtre *lichide*. Gelatina se deteriorează însă din cauza căldurii radiate de sursa de lumină.

Aceste ultime tipuri de filtre nu se vor monta niciodată prea aproape de sursa de lumină, sau în planul imaginii sursei. Pentru ca o culoare

determinată să fie cît mai puțin supărătoare, trebuie ca preparatul să fie fotografiat cu radiații, avînd lungimea de undă cuprinsă în banda de absorbție a colorantului folosit. Prin urmare, trebuie să se cunoască benzile de absorbție specială ale coloranților biologici mai des utilizați, precum și curbele de transmisie ale filtrelor disponibile.

4.8.4. DETERMINAREA TIMPULUI DE EXPUNERE

În microfotografiere este mult mai dificil să se determine cu precizie timpul de expunere, decît în fotografia normală. Totdeauna va fi necesară efectuarea mai multor expuneri la o intensitate absolut identică a luminii, iar filmele sau plăcile trebuiesc developate în condiții absolut identice.

Se va fixa un timp minim de expunere, de exemplu 2 s, iar clișeele următoare se vor expune în progresie astfel : 4 s, 8 s, 16 s, 32 s.

Se alege cel mai bun clișeu din serie, care se prelucrează, iar în expunerile următoare se folosește aceeași intensitate de lumină, lucrîndu-se în condiții identice.

Această metodă se aplică în cazul utilizării dispozitivelor la care se găsesc adaptate aparate fotografice de format mic. În cazul aparatelor de format mare ca : Exacta Varex, Contax, Exa, Practica, timpul de expunere se stabilește prin fixarea unei manete indicator la nivelul uneia din cifrele indicate pe un disc mobil.

Dacă expunerea trebuie să fie mai mare de o secundă, maneta indicator se fixează în dreptul literei „B". În acest caz pentru expunere este necesar a avea la dispoziție un cronometru sau un ceas cu secundar.

În cazul folosirii *exponometrelor* la microfotografiere, pentru determinarea timpului de expunere intră în calcul și sensibilitatea emulsiei, a filmului folosit. Exponometrul se potrivește la deschiderea 8 ; timpii de expunere astfel determinați sînt capabili pentru expunerea respectivă, împărțindu-se valoarea dată de aparat cu cifra 4.

Expunerea, precum și prelucrarea clișeelor obținute este identică în toate cazurile, în afară de fotografia în infraroșu și în culori, unde este necesară o tehnică specială care va fi descrisă în capitolul respectiv.

4.8.5. GROSISMENTUL MICROFOTOGRAFIEI

Alegerea grosismentului este determinată de puterea de rezoluție și de cîmp.

Dacă dorim să reproducem o suprafață mare la un grosisment mic, se sacrifică o parte din puterea de rezoluție ; dacă dimpotrivă, vrem să efectuăm lucări delicate asupra unor obiecte foarte mici, lucrăm cu grosismente maxime.

Folosind formula dată mai sus $\left(G_{foto} = G \text{ microscop} \times \frac{T}{250}\right)$ în care T este lungimea în milimetrii a camerei fotografice, în cazul folosirii camerei fotografice Zeiss Standard sau a dispozitivului Miflex, vom avea valorile date în tabelul 3.

Tabelul 3

Dispozitivul Miflex, vom avea valorile date în tabelul 3.

G_{ob}	G_{oc}	T	Mărire de copiere	G_{total}
40 X	8 X	500 mm	1 X	640 X
40 X	15 X	270 mm	1 X	640 X
40 X	8 X	125 mm	4 X	640 X

Prima combinație este logică, iar a treia foarte practică, permițînd utilizarea economică a aparatelor de format mic.

Emulsiile cele mai practice folosite în diferite categorii de lucrări sînt date în tabelul 4.

Tabelul 4

Subiecte	Emulsii
Histologie, microfotografii tehnice	Pancromatice cu granulații fină și contrast
Entomologie	Ortocromatice
Botanică	Ortocromatice cu granulație fină
Instantanee (microorganisme vii)	Pancromatice ultrarapide

În ce privește puterea de rezoluție a diferitelor categorii de emulsii, dăm următoarele date :

Materialul de reproducere . . . . . circa 100 linii/mm
Filme pozitive . . . . . 70 linii mm
Filme cu granulație fină 10/10 DIN . . . . . 75 linii/mm
Material negativ 16 — 17/10 DIN . . . . . 55 linii mm

În tabelele 23--27 sînt reproduse caracteristicile materialelor fotografice Agfa, folosite în microfotografiere și alte date practice.

4.8.6. PRACTICA MICROFOTOGRAFIERII

Pentru obținerea unei microfotografii de bună calitate, trebuie ca pe lîngă condițiile și factorii amintiți în capitolele anterioare, să se acorde o atenție deosebită pregătirii preparatului microscopic.

O microfotografie înregistrează toate defectele, inclusiv cele care scapă ochiului.

Preparatul trebuie să fie foarte subțire. Lama va avea grosimea de 0,8—1 mm, iar lamela va avea o grosime de 0,15—0,18 mm.

— Alegerea sistemului optic se va face în funcție de subiect și de rezultatul dorit ; puterea de rezoluție, profunzimea sau cîmpul mare.

— Pentru un preparat botanic secționat, de exemplu, se va alege un obiectiv cu apertura mică, iar diafragma condensorului va fi deschisă puțin ; se va utiliza un ocular puternic.

— La fotografierea bacteriilor, obiectivul va fi cu imersie și prezentînd o apertură mare, iar condensorul va fi puțin diafragmat.

— Pentru secțiuni și frotiuri de suprafață mare pe lame, se vor folosi obiective speciale de cîmp plan, cu oculare adecvate. După condițiile în care se pot efectua microfotografiile, acestea se clasifică în :

— microfotografii în alb-negru ;

— microfotografii în culori.

Atît unele cît și celelalte se execută în următoarele condiții de iluminare :

— iluminarea obiectului prin transparență, în cazul studierii preparatelor transparente (frotiuri microscopice, diverse secțiuni biologice etc.);

— iluminarea obiectului prin incidență în cazul studiedii corpurilor opace sau a structurii cristaline a materialelor.

Razele de lumină cad fie perpendicular pe suprafața de cercetare, printr-un sistem optic special al microscopului, fie oblic.

În afara fotografierii preparatelor în cîmp luminat, prezentate anterior mai sînt cunoscute și alte metode speciale de microfotografiere, cum sînt : *microfotografierea în cîmp întunecat, microfotografierea prin contrast de fază, microfotografierea în lumină polarizată, microfotografierea în lumină fluorescentă (ultraviolet), microfotografierea în infraroșu, microfotografierea în cazul luminii incidente.*

4.8.7. MICROFOTOGRAFIA ÎN CÎMP ÎNTUNECAT (CU FOND NEGRU)

Microfotografia în cîmp întunecat (sau cu fond negru) se realizează la microscopul cu fond negru, care se deosebește de microscopul fotonic prin faptul că razele de lumină nu ajung direct în obiectiv, iar imaginea este creată numai de razele reflectate, refractate sau difractate.

Principiul acestei metode de observare are la bază utilizarea unui fenomen evidențiat în mod curent în natură, fenomenul Tyndal. Această metodă a fost elaborată de savantul austriac R. ZIGMOND (Fig. 41).

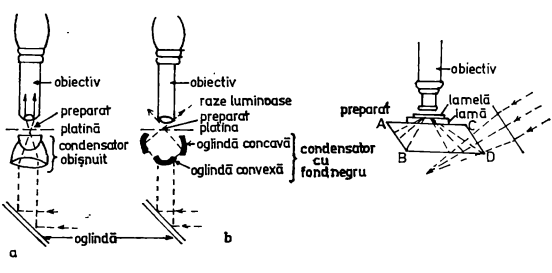


Fig. 41 — Schema microscopului fotonic (a) și cu fond negru (b).

Cînd dimensiunile particulelor scad sub 200 μ, microscopul cu fond negru pune în evidență numai ceea ce în fizică se numește o imagine cu difracție, fără nici o indicație asupra formei, măririi sau structurii obiectului.

Prin această metodă pot fi puse în evidență particule ultramicroscopice, mai mici față de capacitatea de separare a obiectivului care la microscopul fotonic nu pot fi observate.

Pentru a obține o imagine corespunzătoare la microscopul cu cîmp întunecat, trebuie să respectăm o serie de reguli, dintre care cele mai importante sînt :

— lichidul de imersie și preparatul nu trebuie să conțină bule de aer ; mediul obișnuit de includere este apa ;

— lamele și lamelele recomandate sînt cele cu grosimea de 0,8—1,2 mm și respectiv 0,17 mm. Acestea trebuie să fie perfect curățate, deoarece orice particulă materială dispersează lumina ceea ce este nedorit, îngreunînd observarea ;

— preparatele trebuie să fie folosite subțiri (unistratificate) ;

— centrarea luminii să fie perfectă ; respectînd principiul lui Keler ;

— se utilizează în special obiectivele uscate pînă la apertura de 0.85, iar dintre cele cu imersie numai cele speciale de 90 x și 60 x, prevăzute cu diafragma iris.

Diafragma iris a obiectivului cu imersie este absolut necesară pentru obținerea cîmpului întunecat, întrucît apertura normală a acestui obiectiv depășește apertura conului de lumină a condensorului special de cîmp întunecat ;

— iluminarea preparatului se face în exclusivitate lateral și cît mai oblică, împiedicînd pătrunderea razelor luminoase direct în obiectiv. Acest lucru se realizează cu ajutorul unui condensor special numit *cardioid* sau *paraboloid*, cu cîmp întunecat, ce elimină lumina transmisă, preparatul microscopic fiind iluminat numai de lumina oblică. De fapt, acest tip deosebit de condensor constituie singura diferență structurală dintre microscopul cu cîmp întunecat și microscopul fotonic.

Condensorul cardioid sau cu cîmp negru este alcătuit dintr-o oglindă convexă centrală, care dispersează fasciculul de raze paralele la două oglinzi concave laterale, care primesc razele luminoase dispersate de oglinda convexă și le transmit la preparat luminîndu-l foarte oblic, fără ca nici o rază să pătrundă direct în obiectiv. Ca urmare, în tubul microscopului și la ochiul observatorului ajung numai acele raze care sînt refractate sau difractate de particulele din cîmp al căror indice de refracție este mai mare decît al mediului de imersie. Obiectele apar cu un contur strălucitor pe un fond întunecat cărora li se poate analiza forma și dimensiunea, dar nu și structura.

La acest tip de microscop se pot atașa sisteme de fotografiere utilizate la microscopul fotonic, obținînd imagini corespunzătoare (alb pe fond negru).

Executarea examenului cu fond întunecat

Fixăm un condensor cardioid sau paraboloid în manșonul de metal, înlocuind condensorul obișnuit. Se coboară puțin condensorul, apoi se pune o picătură de ulei de cedru pe lentila superioară a condensorului. Se așază lama cu preparatul proaspăt, de pildă o picătură de apă cu colonii de *Nostoc commune* (cleiul pămîntului), o picătură dintr-o cultură bacteriană de leptospire, între lamă și lamelă, după care se ridică con-

densorul încet pînă cînd picătura de ulei de cedru vine în contact cu fața inferioară a lamei cu preparatul de examinat. Pentru a evita formarea bulelor de aer este recomandabil să așezăm o picătură de ulei de cedru și pe fața inferioară a lamei cu preparatul de examinat și în acest fel prin ridicarea condensorului contopim cele două picături de ulei de cedru.

Se pune la punct imaginea la început cu un obiectiv slab 3 x sau 20 x. Dacă oglinda este bine orientată trebuie să se vadă în centrul cîmpului o pată luminoasă. Această pată, care corespunde imaginei sursei de lumină, trebuie să fie adusă cu ajutorul mișcărilor oglinzii în centrul cîmpului, iar prin ușoare mișcări pe verticalitate ale condensorului trebuie micșorată la maximum. Dacă preparatul nu se găsește în planul orizontal, ci mai jos sau mai sus, pata luminoasă ia o formă inelară.

Atunci cînd imaginea sursei de lumină este centrală și pusă la punct corect se pune o picătură de ulei de cedru pe lamelă și se examinează cu obiectivul de imersie.

Atragem în mod deosebit atenția asupra faptului că toate condensoarele de cîmp întunecat au un focar foarte scurt, de maximum 1,1 mm, astfel încît ele nu pot fi utilizate decît dacă lamelele de sticlă sînt foarte subțiri, grosimea maximă a lamelei 0,8—1,2 mm. În ceea ce privește obiectivele care pot fi utilizate pentru examenul în cîmp întunecat, recomandăm toate obiectivele uscate pînă la apertura de 0,85, iar pentru imersie obiectivele speciale 90 x cu diafragma iris și 60 x (A = 0,1) cu diafragmă iris.

Apoi după ce am examinat preparatul, avînd imagini clare în cîmpul întunecat se atașează dispozitivul Miflex sau tubul intermediar cu aparatul Exacta Varex. Pentru obținerea de microfotografii se folosește aceeași tehnică prezentată la microscopul optic (fotonic).

4.8.8. MICROFOTOGRAFIA ÎN CONTRAST DE FAZĂ

În biologie, cele mai multe preparate microscopice sînt atît de uniform transparente, încît structurile lor rămîn invizibile cu microscopul obișnuit, dacă nu le colorăm.

Microscopul cu contrast de fază permit studiul lor fără nici un artificiu de culoare. Întrucît fixarea prealabilă a preparatului, deci omorîrea celulelor nu mai este necesară, se pot urmări direct, sub obiectivul microscopului procese vitale în desfășurare.

În aceste cazuri, interpretarea imaginii trebuie făcută cu mult discernămînt întru-cît prin procedeul prin care se obține contrastul intervenindu-se în focarul posterior al obiectivului, în locul unde se formează imaginile de difracție, se pot produce falsuri de imagini.

În general, aceste falsuri se limitează la apariția unui halou în jurul obiectelor, așa numitul fenomen de inversiune, pete clare în interiorul unor obiecte care ar trebui să fie uniform întunecate.

Ținînd seama însă de artefactele de structură care apar în urma fixării și colorării, sînt mai grosolane și dăunează observației corecte, iar importanța unui asemenea mijloc de investigație este evidentă.

Cu microscopul fotonic, structurile vizibile sînt perceptibile grație faptului că reţin atîta lumină încît dau naştere scăderii de intensitate luminoasă (contraste) suficiente pentru a fi percepute.

Aceste scăderi de intensitate se datoresc de fapt, scăderii de amplitudine a vibraţiilor.

Preparatele microscopice care dau asemenea imagini se numesc „preparate de amplitudine". Acesta este cazul preparatelor microscopice transparente, dar colorate. Preparatele de amplitudine, dau naştere în planul focal şi cel al imaginii unor serii de maxime şi minime luminoase, deci unor variaţii de intesitate luminoasă a căror distribuţii în spaţiu corespunde distribuţiei structurilor obiectului.

În cazul preparatelor microscopice transparente şi incolore, viteza de propagare a vibraţiilor luminoase este încetinită în medii mai dense cu indice de refracţie mai mare, sau în porţiunile mai groase în raport cu porţiunile învecinate mai subţiri ale obiectului, amplitudinea ondulaţiilor rămînînd însă constantă. Se nasc astfel în planul focal şi în planul imaginii, diferenţe de fază a căror distribuţie în spaţiu corespunde distribuţiei structurilor obiectului.

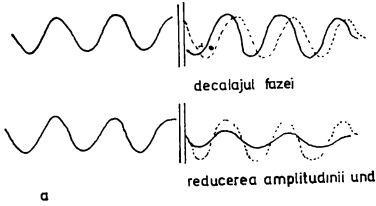
Preparatele microscopice care întîrzie în anumite locuri mersul luminii, fără a provoca scăderi de intensitate luminoasă, se numesc „preparaţii de fază". Atît ochiul cît şi placa fotografică sînt insensibile faţă de diferenţe de fază, percep numai diferenţe de intensitate ; de aceea preparatele de fază nu dau imagini vizibile. Întrebarea care se pune este dacă variaţiile de fază survenite în mersul razelor nu pot fi transformate în variaţii de intensitate luminoasă. În caz afirmativ, imaginea vizibilă a preparatului de fază ar deveni vizibilă.

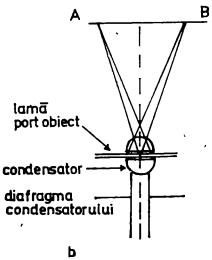
Problema a fost rezolvată în anul 1932 de fizicianul olandez F. ZERNICKE.

Vibraţiile care provin de la detaliile preparatului, mai refringente sau mai groase şi care sînt întîrziate în raport cu vibraţiile care provin din porţiunile înconjurătoare şi care constituie lumina directă, sînt pe de o parte descompuse vectorial în vibraţii de aceeaşi fază şi amplitudine cu a luminii directe, iar pe de altă parte în vibraţii care reprezintă lumina difractată şi care sînt întîrziate cu 1/4 din lungimea de undă. Pentru a putea acţiona este necesar să se separe, în focarul posterior al obiectivului, locul prin care trece lumina directă de locul prin care trece lumina difractată.

Aceasta se realizează limitînd în dreptul diafragmei de apertură al condensorului şi deci şi în focarul posterior al obiectivului, secţiunea fasciculului de luminare la un cerc cît mai îngust. Dacă acoperim acum restul suprafeţei lentilei obiectivului, care se află în focarul posterior, cu un strat transparent dintr-o anumită substanţă, de alt indice de refracţie decît al sticlei care are menirea să întîrzie razele difractate cu încă 1/4 din lungimea de undă, deci în total cu 1/2 vom aduce direcţia vectorilor reprezentînd aceste raze în opoziţie cu direcţia vectorilor, reprezentînd razele directe.

Prin interferență, în planul imaginii, amplitudinea razelor directe va fi micșorată în dreptul detaliilor mai refringente sau mai groase, care vor apare mai întunecate decît mediul înconjurător, devenind astfel vizibile (Fig. 42).





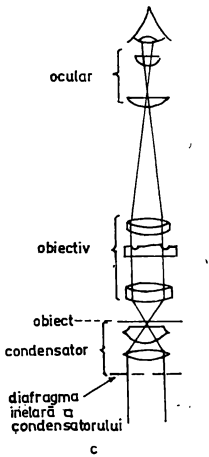


Fig. 42 — Schița microscopului cu contrast de fază: a — amplitudinea razelor directe; b, c — direcția razelor în microscopul cu contrast de fază

Pentru a mări contrastul, întrucît amplitudinea razelor directe în dreptul cercului prin care trec acestea din urmă, depunînd pe acest cerc un strat metalic absorbant, semitransparent.

În aceste condiții, imaginea de fază este transformată într-o imagine de amplitudine cu contraste viguroase, detaliile obiectelor studiate devenind perfect vizibile, putînd fi de asemenea înregistrate clar pe placa fotografică.

Punerea în funcție a microscopului cu contrast de fază și obținerea unor microfotografii, comportă următorii timpi, sau etape :

1. Obiectivele obișnuite ale microscopului optic se înlocuiesc cu obiectivele de contrast de fază. Acestea au pe montura lor marcate literele F sau pH (phase). Dacă privim prin ele se vede plăcuța inel a lui Zernicke ;

2. Condensorul obișnuit se înlocuiește cu condensorul cu revolver, destinat examenului cu contrast de fază. Revolverul se învîrtește pînă cînd numărul diafragmei inelare a condensorului corespunde cu numărul obiectivului întrebuințat :

3. Preparatul de examinat se așează pe platina microscopului iar tubul microscopului se coboară pînă la poziția de punere la punct.

4. Se introduce în tubul microscopului în locul ocularului, o lunetă specială cu viză care se află în cutia microscopului ; aprindem lumina și dăm oglinzii poziția potrivită ; privim prin lunetă, mișcînd segmentul ei superior pînă se văd clar, inelul luminos al diafragmei condensorului și inelul întunecos al marginii plăcuței de fază ;

5. Învîrtim vizele oblice ale condensorului pentru contrast de fază, pînă cînd cele două inele apar exact concentrice ;

6. Înlocuim luneta specială printr-un ocular obișnuit. Punem la punct și examinăm ca de obicei.

Microscopul cu contrast de fază poate fi folosit nu numai la examenul preparatelor necolorate, a celulelor vii din culturile de țesuturi sau cele microbiene, dar poate fi avantajos și pentru examinarea preparatelor slab colorate (rickettsii, treponeme).

Microscopul cu contrast de fază permite observarea și urmărirea în timp a celulelor vii. Pentru a obține însă rezultate bune, sînt necesare anumite condiții : celulele trebuiesc să fie examinate într-un dispozitiv de cultivare format din suprafețe perfect plane și paralele, din sticlă de calitate superioară. Înălțimea camerei de cultură nu trebuie să depășească 4—5 mm. Mediul nutritiv va avea un indice de refracție cît mai apropiat de cel al citoplasmei, spre a evita sau reduce zona de strălucire care apare în jurul celulei, datorită diferenței de densitate dintre mediul nutritiv și celulă. O metodă mai simplă este de a face culturile pe lame și tuburi Barski sau în alte vase de cultură și de a aplica lamela cu fața pe care se află cultura în jos, pe o lamă pe care s-a depus o picătură de mediu ; prin această metodă însă cultura celulară nu poate fi observată în evoluție.

La microscopul cu contrast de fază se atașează dispozitivele de microfotografiere (tubul intermediar sau Miflexul) cu aparatul Exacta Warex, Practica, Exa ș.a., obținînd diverse stadii clare ale culturilor de celule vii, sau celule slab colorate.

Un procedeu de contrast de fază negativ a fost imaginat de WILSKA, denumit MICROSCOPUL ANOPTRAL, în care imaginile apar clare pe un fond mai întunecat brun. Aici inelul absorbant are o transparență extrem de mică de numai 10%, ceea ce conferă metodei o sensibilitate foarte ridicată, putîndu-se astfel decela detalii care diferă foarte puțin de mediul înconjurător ca indice de refracție sau grosime.

O altă metodă de contrastare este cea care utilizează *microscopia cromoanoptrală*, care spre deosebire de contrastul de fază clasic, dă în același timp atît imagini negative cît și pozitive prin simpla schimbare a punerii la punct cu viza micrometrică. În linii mari contrastul cromoanoptral este un contrast de fază negativ combinat cu un contrast de defocalizare pozitiv colorat. Imaginile negative sînt mai luminoase decît cîmpul înconjurător care este galben iar imaginile pozitive sînt colorate în diferite culori vii în raport cu proprietățile optice de refringență și grosime a obiectelor.

Posibilitatea trecerii continue de la imaginile negative la cele pozitive colorate în cadrul aceluiași dispozitiv de microscopie, ușurează mult perceperea detaliilor extrem de fine iar apariția simultană în cîmpul microscopului al imaginilor pozitive și negative, a detaliilor situate în planuri diferite, determină apariția unei imagini mai sintetice, viu și nuanțat colorate a obiectelor studiate.

4.8.9. MICROFOTOGRAFIA ÎN LUMINĂ POLARIZATĂ

Microscopul cu lumină polarizată permite efectuarea unor cercetări asupra structurii interne a materiei. În biologie s-au obținut date foarte prețioase despre constituenții cloroplastelor, despre structutra cristalină a granulelor de amidon, a fusului mitotic, a proteinelor fibrilare ș.a.; în mineralogie, el este folosit pentru determinarea compoziției rocilor și a mineralelor metalifere, iar în chimie servește la analiza calitativă a unor infime cantități de substanțe.

Microscopul cu lumină polarizată sau polarizant reprezintă o variantă a microscopului optic sau fotonic care în locul luminii normale utilizează lumina polarizată (fig. 43).

Lumina polarizată se deosebește de lumina normală prin faptul că vibrațiile sale se efectuează într-un singur plan, față de prima la care vibrațiile se propagă sub forma de unde transversale în toate direcțiile.

Microscopul pe lumină polarizată realizează tocmai acest fenomen de polarizare a luminii datorită unor dispozitive de polarizare și analizare a luminii cunoscute sub denumirea de *polarizare* sau *nicoli*.

O primă prismă Nicol sau filtru polarizor, este plasată între sursa luminoasă și obiectul care se studiază; acesta este plasat pe o platină turnantă care permite rotirea ei și odată cu ea și a lamei port obiect.

Al doilea polarizor, destinat să analizeze lumina după trecerea prin obiect, este așezat între obiectiv și ocular. Aceasta se numește *prisma analizator* sau *analizator* (Nicol). Nicolii se obțin prin tăierea unui spat de Islanda, perpendicular pe direcția razei incidente, relipind la loc suprafețele cu balsam de Canada. Nicolii pot fi: a. *încrucișați* — atunci cînd sînt așezați în lungul aceleiași axe optice, avînd secțiunile princi-

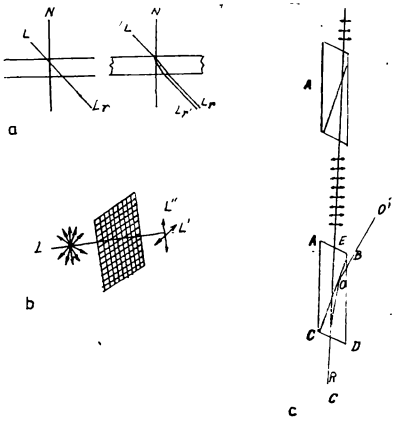


Fig. 43 — Schema microscopului polarizant: a. direcția razelor luminoase într-o substanță; b. acțiunea unei raze incidente asupra unui corp birefrigent; c. polarizarea luminii prin prisma Nicol.

pale în două plane perpenediculare și b. *paraleli,* atunci cînd sînt așezați în lungul aceleiași axe optice, avînd secțiunile principale în același plan.

La majoritatea microscoapelor polarizante moderne, nicolii sînt înlocuiți cu plăci din mase plastice conținînd compuși organici cu proprietăți optice speciale. Aceste plăci se numesc „polaroizi" și se comportă la fel ca polarizoarele.

Principiul de funcționare a microscopului polarizant este următorul: Razele luminoase nepolarizate, pătrund în prisma Nicol, prin una din fețele sale; ele sînt descompuse în două raze care vibrează în unghi drept una în raport cu cealaltă; *raza ordinală,* care se supune legilor refracției și suferă o reflexie totală și *raza extraordinală,* care este transmisă cu altă viteză și ale cărei vibrații se stabilesc în planul figurii.

Lumina transmisă prin prisma Nicol este deci polarizată într-un singur plan. Dacă un al doilea Nicol este plasat în serie cu primul și într-o poziție identică cu primul, lumina polarizată este transmisă. Prin rotirea analizatorului cu 90°, nicolii devin încrucișați, cîmpul vizual devine întunecat. În această situație, dacă între cei doi nicoli se interpune un corp birefrigent (cristalizat), el devine strălucitor, ceea ce indică că el a fost polarizat de lumina care-l traversează. Dacă se rotește încă odată analizatorul cu 90°, cîmpul devine obscur. Unghiul de rotație al celei de a doua prisme, necesar pentru a restabili obscuritatea, măsoară deviația planului de polarizare a luminii prin obiectul interpus.

Rotind analizatorul cu 360° se trece de două ori printr-o poziție în care planurile de polarizare ale celor doi nicoli sînt paralele (maximum

de claritate) și de două ori în cruce, în unghiu drept (obscuritate absolută). Dacă nicolii sînt încrucișați formînd un unghi oarecare, cantitatea de lumină care trece prin analizator este cu atît mai mare cu cît unghiul format de cei doi nicoli este mai mic.

Dacă un obiect transparent este examinat între nicolii încrucișați, cîmpul poate rămîne obscur sau se poate lumina mai mult sau mai puțin. În cazul în care cîmpul rămîne obscur în tot timpul unei rotații complete a platinei, corpul poate fi considerat ca *monorefringent* sau *izotop*.

Dacă rotim obiectul în același plan ,cîmpul se întunecă și se luminează de patru ori, se poate trage concluzia că **obiectul deviază planul** de polarizare al luminii și că este *birefringent* sau *anizotop*.

Obiectul examinat a modificat raza extraordinară ieșită din polarizor și a împărțit-o în două raze din care una provoacă în analizor o rază extraordinară care stabilește iluminarea.

Pentru microfotografierea cu dispozitive la care se adaptează aparate fotografice de format mic, cel mai rentabil este aparatul cu analizor tubular.

Aparatele cu oglindă, tip Exacta Warex, fixare cu ajutorul unor tuburi intermediare permit fotografii exacte în unele cazuri cînd razele luminoase, uneori destul de slabe, nu sînt absorbite de geamul mat. Oglinda argintată pe suprafață nu acționează, în acest caz, asupra fenomenelor de polarizare, astfel încît formatul dreptunghiular al camerei poate sta în orice poziție față de direcția de vibrație a analizatorului.

La tubul universal Miflex, trebuie să se verifice existența efectului de polarizare, în cazul cînd în prospect nu se găsesc indicații. Tubul se mișcă circular față de direcția de vibrație a analizatorului. Dacă în acest caz fenomenele de polarizare se schimbă, eroarea cauzată de reflexie trebuie înlăturată în modul următor. Între nicolii încrucișați în poziția de execuție se plasează un obiect cu pozițiile de execuție exact cunoscute (obiect „etalor"). Se depărtează analizorul și se rotește camera față de polarizor pînă cînd apare obscuritatea.

Planul de vibrație al analizorului, introdus din nou, este acum paralel cu orizontala de pe suprafața reflectată.

Numai pentru această poziție, imaginea observată în luneta de punere la punct este în concordanță cu situația reală.

Pentru microfotografierea în lumină polarizată, obiectivele apocromatice dau cele mai bune rezultate din cauza bunei lor corecții cromatice. Prin măsurarea exactă a mărimilor caracteristice fenomenelor de polarizare, vom utiliza obiective acromatice.

Obiectivele aprocromatice și semiaprocromatice au elemente optice alcătuite din spatfluor, care prezintă birefringență. Datorită gamei de culori destul de întinse care se obțin în cazul microscopiei în lumină polarizată este bine să folosim material fotografic ortopancromatic (tabelele 26—29), dacă nu preferăm să diminuăm contrastul prin folosirea luminii monocromate. Se recomandă o developare pentru granulație fină. Rezultate foarte bune se obțin folosind lampa cu impulsuri de lumină. În cazul studierii rocilor și minereurilor, acestea se studiază în lumină polarizată, prin iluminarea incidentă, după ce s-a șlefuit foarte fin suprafața de cercetat.

Examinarea metalografică în lumina obișnuită, după pregătirea suprafeței obișnuite a metalului de studiat, poate fi completată și prin studierea în lumină polarizată.

Cînd se fotografiază suprafețe șlefuite folosind dispozitivul Miflex, sau tuburile intermediare nu va da întotdeauna rezultate bune. Se va prefera utilizarea camerelor fotografice verticale cu burduf (tip Zeiss-Standard).

La cercetarea preparatelor biologice trebuie să se acorde multă atenție modului de pregătire al acestora.

Deparafinarea preparatelor trebuie să fie foarte îngrijită.

Rămînerea unor urme de parafină la nivelul membranelor nucleare și hematiilor, dau fenomene de birefringență supărătoare.

În anumite structuri de fibre, direcțiile în care indicii de refracție pentru vibrațiile paralele cu această axă este mai mare decît acel al vibrațiilor perpendiculare pe ea, birefringența fiind pozitivă.

La nucleoproteine, indicele de refracție pentru vibrațiile paralele cu lungimea axului este mai mic decît acel pentru vibrațiile perpendiculare. În acest caz avem de a face cu o birefringență negativă.

Cînd se studiază un preparat biologic, semnul negativ sau pozitiv al birefringenței se poate determina cu o lamă de gips care se plasează într-o fantă, în corpul microscopului sub analizor. Această lamă este un obiect birefringent care dă așa-numitul „roșu de prim ordin", acest efect se obține datorită întîrzierii cunoscute a razelor luminoase, pe care o provoacă această lamă.

Atunci cînd nicolii sînt încrucișați, placa de roșu „de prim ordin" dă un „cîmp roșu" pentru că provoacă o întîrziere de o lungime de undă pentru a lumina $\lambda = 551$ mμ (galbenă-verde). De pildă, dacă un preparat de birefringență pozitivă (de exemplu fibre musculare) este așezat pe platina microscopului și orientat la 45° în raport cu planele de polarizare, fibra apare albastră în cîmp roșu. Dacă fibra este orientată la 90° față de această poziție, ea va apare galbenă sau portocalie. Semnul birefringenței poate fi deci dedus din culoarea obiectului, atunci cînd se folosește placa de gips care dă roșul de prim ordin.

Cînd se trece la microfotografiere, trebuie să se țină seama de toate impuritățile și defectele dispozitivului microscopic, situate în apropierea diafragmei cîmpului vizual și a cîmpului de iluminare, care dau erori nedorite și imagini false.

De aceea trebuie să verificăm curățenia ocularului și a filtrelor. Curățirea ocularului o putem verifica prin rotirea lui în jurul axei. Deplasarea punctelor și impurităților, odată cu rotirea, ne indică existența urmelor de praf.

Cînd folosim lumina polarizată, vom avea grijă ca polarizorul să fie intercalat între geamul mat și lentilele condensorului. În caz de inversare, geamul mat produce depolarizarea luminii.

4.8.10. MICROFOTOGRAFIA ÎN LUMINĂ FLUORESCENTĂ

Microscopia fluorescentă ocupă un loc important în studiile de microbiologie și citohistologie. Ea se bazează pe proprietatea pe care o au o serie de substanțe de a deveni luminoase (luminiscente) în cazul în

care sînt traversate de un flux de raze invizibile, cu lungimea de undă scurtă (violete, ultraviolete, röntgen etc.).

La început se observa doar fluorescența proprie, la raze ultra violete a anumitor țesuturi vegetale și animale, precum și a anumitor substanțe importante din punct de vedere tehnic.

În anul 1929, C. ZEISS a construit împreună cu ELLINGER. un microscop cu fluorescență intravital care servea la observarea proceselor fiziologice la animalele de experiență vii. În organele ce trebuiau observate se injectau lichide fluorescente. Aceste metode au fost folosite și la colorarea preparatelor histologice pentru studiul în ultraviolet.

În anul 1931, HEISSINGER, introduce termenul de fluorocromizare adică de impregnare a preparatelor cu produse fluorescente.

Dintre fluorocromii mai des utilizați menționăm : acridina-galbenă, acridina-orange, auramina, triptoflavin, rhodamina 3 C, galben de tiazol G, sulfat de berberină, primulină, fluoresceină, uranină, fuxină acidă ș.a.

Aceste substanțe se aplică în soluții foarte puternice (pînă la 10^{-4}) și trebuie păstrate în sticle brune la întuneric. Cei mai buni fluorocromi s-au dovedit a fi substanțele naturale ca : *clorofila, berberina, chinina* ș.a.

Ca și ceilalți coloranți fluorocromici se fixează selectiv pe diverse structuri celulare față de care au afinitate. Astfel, galbenul de tiazol G, colorează citoplasma, iar sulfatul de berberină nucleii, ș.a.m.d. Acești coloranți, sub acțiunea radiațiilor ultraviolete devin fluorescenți, evidențiind structurile pe care le fixează. Ca exemplu, putem da lignina, care în prezența orangelui de acridin, manifestă o fluorescență secundară, roșie. Se observă imagini policrome deoarece diferite celule a unui țesut sau constituenții aceleiași celule se comportă selectiv față de fluorocrom, ceea ce permite studiul lor.

Prin urmare, preparatele la microscopul cu fluorescență apar luminiscente pe un fond întunecat. Montarea preparatelor trebuie făcută în medii nefluorescente cum sînt : glicerina, uleiul de parafină, metacrilatul de izobutil, alcooli polivinilici sau soluție fiziologică.

Microscopia prin fluorescență se folosește în paleontologie, petrografie, mineralogie, chimie, criminalistică și mai ales în microbiologie, unde se utilizează două procedee interesante și anume : a. *anticorpii fluorescenți* și b. *fluorescența bicromă.*

Tehnica *anticorpilor fluorescenți* a fost introdusă în știință de COONSE (1950) și constă în fixarea de către antigenul existent în diferitele componente celulare a anticorpilor omologi conjugați cu o substanță care este fluorescentă în lumina ultravioletă.

Fluorescența bicromă — se folosește în tratarea celulelor cu substanțe fluorescente. care au capacitatea de a transforma lumina razelor ultraviolete în fluorescență bicromă, în funcție de substratul chimic din celulă.

Fluorocromul cel mai des folosit este colorantul acridin orange, care evidențiază acidul ribonucleic din citoplasmă și din nucleol prin lumina fluorescentă de culoare roză — cărămizie, iar acidul dezoxiribonucleic din nucleu prin lumina fluorescentă galbenă-verzuie.

Pentru a putea efectua cercetări și executa microfotografii în lumină ultravioletă, vom avea nevoie de :

— o sursă de lumină puternică ;

— filtre de separare ;
— un microscop cu sistem optic bine ales ;
— cunoașterea tehnicii preparării materialelor care se studiază în ultraviolet, aplicînd coloranții specifici în domeniul de cercetare respectiv ;
— un dispozitiv de microfotografiere echipat cu filme sau plăci, avînd emulsia cea mai potrivită pentru fotografierea în ultraviolet.

Sursa de lumină

Ca sursă de lumină poate fi folosită o lamă de cuarț cu vapori de mercur sau o lampă cu arc voltaic.

Radiațiile cele mai potrivite pentru producerea fluorescenței se găsesc la extremitatea spectrului vizibil în albastrul extrem și la începutul spectrului invizibil, în ultraviolet apropiat. Este necesar să alegem o sursă de lumină extrem de puternică, întrucît filtrele folosite absorb lumina, iar radiațiile ce străbat pînă la preparat trebuie să fie suficient de puternice, pentru a produce fluorescența.

Un dispozitiv practic pentru studiul și microfotografierea în ultraviolet este dispozitivul cu fluorescență produs de întreprinderea Carl Zeiss Jena (fig. 44). Întregul aparat are ca suport un banc de șină, pe care sînt instalate sursele de lumină cu dispozitive anexe și locul unde

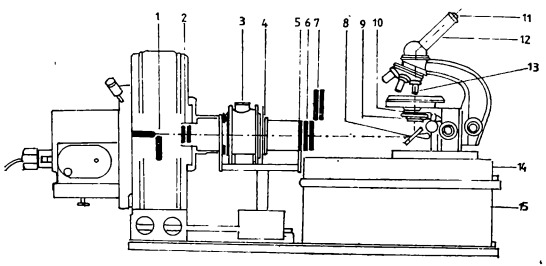


Fig. 44 — Aparatul de luminiscență C. Zeiss Jena : 1. arc de cărbune de 10 A sau 6 A ; 2. partea posterioară a colectorului ; 3. cuvă pentru soluția de sulfat de cupru ; 4. diafragma cîmpului de lumină ; 5. partea anterioară a colectorului ; 6. filtru albastru ; 7. filtru ultraviolet ; 8. oglinda microscopului ; 9 sticlă de uran pentru centrarea luminii ; 10. condensori ; 11. ocular ; 12. tub ocular ; 13. filtru de blocare a ocularului ; 14. placa de lemn ; 15. suportul de lemn.

poate fi fixat microscopul. Lumina este dată de un arc voltaic format între doi cărbuni ce sînt menținuți la o distanță constantă în timpul funcționării, pentru a da lumină constantă, lucru realizat prin dispozitivul de orologerie ce acționează cu cei doi cărbuni.

Urmează apoi un colector, diafragma cîmpului luminos, o cuvă și filtrele de lumină. Cuva este umplută cu o soluție de 1—3% sulfat de

cupru, soluție care joacă rol de filtru. Soluția oprește trecerea radiațiilor roșii și infraroșii, împiedicînd o supraîncălzire a filtrelor sensibile la căldură, precum și o eventuală alterare a preparatului. Concentrația va fi cea mai potrivită în cazul în care obiectul va apare luminos pe un fond cît mai întunecat. Soluția de sulfat de cupru, trebuie din cînd în cînd împrospătată. Filtrele de selecție a razelor sînt constituite din două filtre transparente pentru ultraviolet (Schott U. G. 1) de 3,5 și 1,5 mm și două filtre albastre (Schott B.G. 3) de 4 și 2 mm grosime.

Pentru studiul în ultraviolet poate fi folosit orice microscop. Nu este necesar ca microscopul să aibă sistemul optic din cuarț, pentru că lumina fluorescentă ce ia naștere în preparat aparține spectrului vizibil.

Se întîmplă însă că de multe ori sticla din care sînt făcute lentilele obiectivelor apocromatice să prezinte o fluorescență proprie, astfel că imaginea obținută este denaturată.

Folosirea lamelelor construite dintr-o sticlă ce oprește razele ultraviolete, îndepărtează acest fenomen supărător.

În afară de filtre de lumină, mai sînt folosite filtre de blocare, care sînt așezate pe ocular. Aceste filtre împiedică trecerea luminii ultraviolete sau albastre care a pătruns prin preparat și nu s-a transformat în lumină de fluorescență, putînd stînjeni observarea. Pentru observările în ultraviolet se folosește, ca filtru de blocare, o sticlă galben-deschisă, care oprește complet razele ultraviolete, fiind însă transparentă mai ales pentru regiunea de spectru dintre ultraviolet și albastru.

Pentru observările în albastru este nevoie de un filtru galben-portocaliu care trebuie să oprească și lumina albastră. Întrucît acest filtru are o fluorescență proprie, montarea filtrelor este astfel construită, încît filtrul galben se poate monta peste cel albastru. Deci, combinarea filtrelor se va face după **tabelul 5.**

Tabelul 5

Felul excitației	Filtru de lumină	Filtru de blocare
Lumină albastră	B.G. 3	O.G. 1 sau G.G. 9 + O.G. 1
Raze ultraviolete	U.G. 1 sau U.G. 2	G.G. 9

Preparatele vor fi așezate pe o lamă de sticlă obișnuită, care se va verifica înainte, pentru a se stabili dacă nu prezintă o fluorescență proprie. Nu se va folosi un mediu de montare fluorescentă.

Pentru efectuarea lucrărilor în ultraviolet nu este indicată folosirea balsamului de Canada și a uleiului de cedru. Se pot utiliza glicerina, acetatul de potasiu siropos uleiul de parafină, salicilatul de metil etc.

Ca mediu de montare, Heissinger, propune următoarea rețetă:

Gumă arabică albă	10 gr
Glicerină	5 cm^3
Clorat hidrat	7 gr
Apă distilată	10 cm^3

Se pot efectua montări definitv în metacrilat izobutilic sau în alcooli polivinilici.

Fixatorii preparatului nu vor avea săruri de metale grele care inhibă sau micşorează fenomenele de fluorescenţă.

Parafina are o fluorescenţă proprie, deci secţiunile în parafină vor fi bine deparafinate.

4.8.11. DISPOZITIVELE PENTRU MICROFOTOGRAFIERE

Cele mai bune rezultate se obţin cu ajutorul tubului Miflex, întrucît acesta oferă posibilităţi comode şi precise de reglare. La folosirea camerelor Standard verticale, utilizarea plăcilor de 6,5 × 9 cm necesită un timp de expunere de 6,5 ori mai mare, iar la Miflex, în cazul folosirii plăcilor de aceleaşi dimensiuni timpul de expunere va fi de trei ori mai mare.

Expunerea se efectuează în încăperi complet întunecate, întrucît celelalte surse de lumină existente în încăpere generează lumină parazită. Timpul de expunere se determină tot prin expuneri succesive, pornind de la timpul minim de expunere, care este produsul dintre timpul minim de expunere în fotografia la lumină albă şi factorul de expunere (în cazul plăcilor fotografice).

Compoziţia cromatică a imaginilor obţinute prin fluorescenţă nu permite decît folosirea filmelor pancromatice, iar intensitatea scăzută a luminii rezultată, necesită filme cu sensibilitate ridicată. Filmele cu sensibilitate ridicată au însă o granulaţie mare, lucru nepermis în microfotografiere. Rezultate optime se obţin cu Isopan FF, Isopan F şi Superpan, developînd în soluţie Rodinal Agfa cu concentraţia 1 : 40, timp de 8, 10 şi respectiv 12 minute.

În literatura de specialitate se ridică o metodă practică de sensibilizare a plăcilor fotografice pînă la 0,1 μ. Plăcile se introduc cîteva minute într-o baie cu dihidrocholidină. Emulsia se acoperă cu un strat de microcristale, care sub acţiunea razelor ultraviolete devin puternic fluorescente, impresionînd astfel emulsia. Înainte de developare, placa este trecută printr-o baie de acetonă care îndepărtează microcristalele.

În cazul fotografierii obiectelor slab luminate şi mobile, vom folosi metoda subexpunerii şi a developării îndelungate.

La o expunere de 3—4 ori mai scurtă, corespunde o developare de 2 ore în soluţie Rodinal Agfa, 1 : 40, la temperatura de 18°C.

Prin respectarea condiţiilor de lucru, arătate mai sus, vom obţine microfotografii din punct de vedere ştiinţific.

4.8.12. MICROFOTOGRAFIA ÎN INFRAROŞU

Razele vizibile ale luminii sînt cuprinse între 400 mμ şi 760 mμ, iar radiaţiile infraroşii invizibile pentru ochiul uman se întind de la 760 la 3000 mμ.

În cercetările de microscopie interesează radiaţiile infraroşii din jurul a 1000 mμ; între 1000 şi 2000 mμ se găsesc radiaţiile infraroşii de uscare, utilizate în industrie.

Radiaţiile infraroşii, invizibile pentru ochiul uman nu şi-au găsit aplicaţii practice decît în momentul în care VOGEL a descoperit princi-

piile sensibilizării plăcilor fotografice la radiațiile infraroșii, cu ajutorul coloranților.

La începutul secolului al XX-lea s-au descoperit criptocianinele, iar ulterior neocianinele, tricarbocianinele etc., care au permis înregistrarea radiațiilor infraroșii pînă aproape de 1300 mμ.

Pe măsura perfecționării și înregistrării imaginilor în infraroșu, pe plăcile fotografice s-au extins și în domeniul invizibilului. S-a folosit cu succes microfotografia în infraroșu în următoarele cazuri :

— examinarea prin reflexie a suprafețelor ce reflectă radiații infraroșii ;

— examinarea corpurilor opace pentru lumina vizibilă și transparente pentru radiațiile infraroșii ;

— examinarea în lumină infraroșie polarizată a dicroismului sau a birefringenței unor substanțe opace în lumină vizibilă ;

— examinarea prin contrast de fază a multor detalii interne ale obiectelor opace în lumină vizibilă, însă transparente pentru radiații infraroșii.

În cercetările metalografice, radiațiile infraroșii dau bune rezultate la studiul capacității de reflexie a diferitelor structuri metalice.

În biologie, examenul țesuturilor vegetale și animale, opace pentru lumina vizibilă, în lumina infraroșie dă rezultate bune. De exemplu, pentru examinarea țesuturilor vegetale în infraroșu, se pot descoperi diferite boli criptogamice. Chitina insectelor fiind perfect transparentă prin microfotografiere în infraroșu, se pot observa aspectele fiziologice ale organelor interne, la insectele vii.

Ca sursă de radiații infraroșii se poate folosi orice lampă cu incandescență fără nici o modificare, deoarece ea produce o cantitate suficientă de radiații, chiar mai mare decît radiațiile vizibile. Lămpile cu arc, lămpile cu vapori de mercur, tuburile cu descărcări în gaze și lămpile cu filament dau rezultate bune.

În microfotografie, însă, lămpile cu filament din tungsten dau rezultate dintre cele mai bune.

În ceea ce privește sistemul optic al microscopului, obiectivele apocromatice permit efectuarea deplasării la maximum a corecției obiectivului către lungimi mari de undă. Orice microscop, dotat cu filtru de selecție pentru raze infraroșii cu plăci speciale, poate fi folosit fără altă modificare pentru fotografierea în infraroșu.

Condițiile de lucru, materialul fotografic și prelucrarea materialului sînt însă diferite față de fotografia normală.

Ca materiale fotografice cu emulsia sensibilizată în infraroșu, avem plăcile și filmele Agfa, cu următoarele caracteristici (tabelul 10).

Ca putere de rezoluție, plăcile „Hart" și filmul au posibilitatea de a separa 60—65 linii pe milimetru. Plăcile „Rapid" au o putere de rezoluție de 40—45 linii pe milimetru.

Materialele sensibile la raze infraroșii se vor păstra în frigider (cînd sensibilitatea este mai mică, de 900 mμ) sau în zăpadă carbonică (atunci cînd sensibilitatea este mai mare de 900 mμ).

Noile materiale produse de firma Agfa sînt mai puțin pretențioase la păstrare. Astfel, plăcile „Hart" și filmul pot fi conservate timp de 6 luni. La plăcile Infrarot Rapid 850, durata de conservare este de 5 luni.

Tabelul 6

Denumirea materialului	Domeniul de sensibilizare în mμ	Sensibilizarea maximă în mμ
Infrarot 700 Hart	600—740	720
„ 750 Hart	690—770	750
„ 800 Hart	750—880	840
„ 850 Hart	640—760	860
„ 700 Rapid		710
„ 750 Rapid	730—790	770
„ 800 Rapid	740—850	820
„ 850 Rapid	750—870	850
„ 950 Rapid	—	950
„ 1050 Rapid	—	1050
Film Agfa Infrarapid 750 de 35 mm	—	760

La plăcile 1050 limita de conservare este de 15 luni. Acestea din urmă se vor păstra la 0°C, iar primele tipuri se pot păstra la maximum 18°C, umiditatea relativă în frigider trebuind să fie de 50—60%.

Încărcarea casetelor se va face în mod normal iar la expunere se va face întuneric deplin în încăpere.

La preparat şi în obiectiv nu va pătrunde decît lumina filtrată Lumina dată de sursa luminoasă va trebui astfel triată de către filtre, încît la preparat să nu ajungă decît radiaţiile a căror lungime de undă ne interesează. Filtrele care trebuiesc intercalate între sursa luminoasă şi preparat, produse de firmele Agfa şi Jena, sînt date în tabelele 7 şi 8.

Tabelul 7

Filtre AGFA

Indicativ	Culoarea	Transparenţa pt. raze infraroşii la mμ
42	Roşu	600
80	Roşu deschis	580
81	Roşu	600
82	Roşu închis	630
83	Negru	710
84	Negru	730
85	Negru	820
587	Negru	830
589	Negru	870

Tabelul 8

Filtre Jena

Indicativ	Culoarea	Transparenţe pr. raze infraroşii la mμ
RG 1	Roşu deschis	600
RG 2	Roşu	610
RG 5	Roşu închis	660
RG 7	Roşu intens	850
RG 8	Roşu foarte închis	680
RG 9	Roşu intens	720
RG 10	Roşu intens	750
UG 8	Roşu intens	900

Nu se pot utiliza filtrele în mod întîmplător. Ele se vor alege în funcție de sensibilitatea emulsiei plăcii pe care o folosim. De exemplu, plăcile Agfa pentru 800 mμ au o sensibilitate variind între 700—855mμ. Razele sub 700 mμ trebuiesc oprite. Vom folosi de exemplu, filtrul Agfa 85. Dacă vom folosi un filtru absorbant al radiațiilor pînă la 870 mμ (de exemplu Agfa 589), oricît am prelungi expunerea, emulsia nu va fi impresionată, întrucît nu este sensibilă la radiațiile a căror lungime de undă este filtrată de acest filtru. Este bine ca fotografierea să se facă tot sub formă de expunere succesivă. Timpul de expunere va fi însă foarte lung, în raport cu filtrele folosite.

Vom prezenta mai jos tabelele de expunere în funcție de sensibilitatea emulsiilor și de filtrele utilizate, considerînd cifra ca o valoare medie pentru timpul de expunere în cazul respectiv. Timpul de expunere este calculat pentru cazul folosirii unei lămpi nitrafot. Cifrele sînt exprimate în secunde (tabelele 9 și 10).

Tabelul 9

Plăci Rapid

Sensibilitatea în mμ / Indicativul filtrului	Plăci 700	Plăci 750	Plăci 850	Plăci 800	Film 750
	Timpul de expunere, s				
Agfa—42	10	20	20	50	4
Agfa—80	10	20	20	50	4
Agfa—81	10	20	20	50	4
Agfa—82	10	20	20	50	4
Agfa—83	—	30	30	50	10
Agfa—84	—	30	20	40	10
Agfa—85	—	—	—	200	—
Schott RG 1	8	12	12	30	4
Schott RG 2	8	12	12	30	4
Schott RG 5	8	12	12	30	4
Schott RG 8	8	12	12	30	4
Schott RG 9	—	12	12	30	8
Schott RG 10	—	—	20	50	16

Tabelul 10

Plăcile Hart

Sensibilitate în mu / Indicatorul filtrului	Plăci 700	Plăci 750	Plăci 800	Plăci 850
	Timpul de expunere, s			
Agfa—42	10	20	20	50
Agfa—80	10	20	20	50
Agfa—81	10	20	20	50
Agfa—82	10	20	20	50
Agfa—83	—	20	20	50
Agfla—84	—	20	20	50
Agfa—85	—	—	—	200
Schott RG 1	12	16	16	40
Schott RG 2	12	16	16	40
Schott RG 3	12	16	16	40
Schott RG 5	12	16	16	40
Schott RG 8	12	16	16	40
Schott RG 9	—	16	16	40
Schott RG 10	—	—	24	60

În laboratorul de developare, lumina în care se developează materialul fotografic sensibil la radiații infraroșii, trebuie de asemenea să îndeplinească condiții speciale.

Este bine ca și aceste date să fie transpuse sub formă de tabel (tabelul 11).

Tabelul 11

Material	Film protecție Agfa	Puterea lămpii și distanța	Iluminarea
Plăci 700—750	108 Verde închis	15 W 75 cm	directă
Plăci 800 Film infrarapid 750	108 Verde închis	15 W 75 cm	indirectă
Plăci 850—950 Plăci 1050	114 Verde deschis	Lampă foarte slabă 75 cm	directă

În cazul prelucrării filmelor și plăcilor cu emulsie sensibilă la lumină infraroșie, developarea se face tot în revelatori speciali.

Din punct de vedere al timpului de developare și al contrastului obținut, putem să clasificăm revelatorii astfel (vezi tabelul 12).

Tabelul 12

Developanți	Timp de developare	Contrast
Agfa Metol hidrochinon sol. 1 : 5	4— 5 minute	puternic
Agfa 1	4— 5 minute	puternic
Agfa final	8—10 minute	normal
Agfa Rodinal 1 : 20	5— 6 minute	normal
Agfa Rodinal 1 : 40	9—10 minute	slab
Agfa Atomal F	8—10 minute	slab
Agfa 12	12—15 minute	slab
Agfa 14	15—18 minute	slab
Agfa 15	8—10 minute	

Rețetele date în tabelă sînt următoarele :

Agfa 1

Apă	700 cm³
Metol	5 gr
Sulfit de sodiu anhidru	40 gr(80 gr. cristalizat)
Hidrochinoză	6 gr
Carbonat de potasiu	40 gr
Bromură de potasiu	2 gr

Se completează cu apă pînă la 1 litru.

Agfa 8

Se recomandă la developarea plăcilor 950 și 1050

Apă	750 cm³
Sulfit de sodiu anhidru	12,5 gr (25 gr. cristale)
Glicină	2 gr
Carbonat de potasiu	25 gr

Se completează cu apă pînă la 1 litru.

Agfa 12

Apă	750 cm³
Metol	8 gr
Sulfit de sodiu anhidru	6 gr (12 gr. cristale)
Carbonat de sodiu anhidru	6 gr (16,2 gr. cristale)
Bromură de potasiu	2,5 gr

Cu ajutorul acestui revelator se obține o granulație foarte fină. Nu se poate fi folosit la copiile pozitive.

Agfa 14

Apă	750 cm³
Metol	4,5 gr
Sulfit de sodiu anhidru	85 gr (170 gr. sristale)
Carbonat de sodiu anhidru	1 gr (2,7 gr cristale)
Bromură de potasiu	0,5 gr

Se completează cu apă pînă la 1 litru.

Agfa 15

Apă	750 cm³
Metol	8 gr
Sulfit de sodiu anhidru	125 gr (250 gr. sristale)
Carbonat de sodiu anhidru	12 gr. (32,4 gr. cristale)
Bromură de potasiu	1,5 gr

Se completează cu apă pînă la 1 litru.

Operațiile de fixare, spălare și uscare sînt identice cu cele de la fotografia normală.

Suprasensibilizarea

Există posibilitatea ca plăcilor fotografice să li se mărească în mod accentuat sensibilitatea. Se cunosc două metode de suprasensibilizare, pe *cale umedă* și pe *cale uscată*.

a. *Suprasensibilizarea pe cale umedă*

Se prepară următoarea baie :

Apă distilată	1000 cm³
Carbonat de sodiu cristalizat	80 gr
Soluție de amoniac concentrată	80 gr

Se poate dilua 1 : 40 cu apă distilată de la gheață. Plăcile se țin 10 minute în această baie, la temperatura de 10—12°C, apoi se clătesc de cîteva ori cu alcool metilic. Uscarea se face la un ventilator, timp

de 10—15 minute. Ventilatorul nu trebuie să producă scîntei în timpul funcționării. Operația se face în întuneric complet. La plăcile cu sensibilitatea de 700—850 mμ se va obține o mărire a sensibilității cu 20—40 unități, iar la plăcile pentru 950—1050 mμ o mărire cu 80 unități. Se recomandă ca această metodă să se folosească pentru plăcile expirate.

b. *Suprasensibilizarea uscată*

Aceasta este o metodă mai comodă.

Într-un exicator se introduce o sticlă de ceas cu cîteva picături de mercur. Plăcile împachetate în hîrtie neagră se introduc astfel încît vaporii de mercur să acționeze în mod omogen pe întreaga suprafață a emulsiei. Exicatorul se acoperă în mod etanș cu capacul său.

Vaporii de mercur trec prin porozitățile hîrtiei, acționînd asupra emulsiei. Pachetele cu plăci se țin în exicator circa 2—3 zile, la temperatura camerei.

Suprasensibilizarea are aceeași valoare ca și cea realizată pe cale umedă.

4.8.13. MICROFOTOGRAFIA ÎN CAZUL LUMINII INCIDENTE

Iluminarea incidentă se folosește în microscopie în cazul cercetării obiectelor opace, cu suprafețe netede, omogene. Cu ajutorul acestui sistem se studiază suprafețele combustibililor solizi, se cercetează structura microcristalină a aliajelor și metalelor.

Studiul se efectuează cu ajutorul unor microscoape de o construcție specială, ca de exemplu, microscopul Zeiss Lug sau Epignost.

Tot din aceiași categorie fac parte microscoapele metalografice Leitz, Zeiss și Reichert, care sînt prevăzute cu camere fotografice cu plăci avînd formatul 9 × 12 sau 13 × 18 cm.

Majoritatea acestor microscoape nu au nevoie de un grosiment mare (de exemplu microscoapele metalografice), în schimb au nevoie de un cîmp mare.

În aproape toate cercetările microscopice de acest fel, obiectele de cercetat nu vor fi acoperite cu lamelă.

Expunerea și prelucrarea fotografiilor se efectuează conform regulilor de la fotografia prin transparență.

Efecte plastice foarte utile se obțin în cazul microfotografierii combinate cu iluminare prin transparență și prin incidență.

Agest gen de iluminare combinată este folosit la studiul obiectelor constituite din particule în parte opace, în parte transparente pentru lumină, ca de exemplu, fibre textile, pulberi, microcristale etc.

5. TEHNICA EXECUTĂRII DESENELOR

Posibilitățile de redare a imaginii obținute prin analiza unor structuri biologice la microscop sînt azi variate. Cele mai indicate, pentru fidelitatea lor, sînt proiecțiile și microfotografiile. Cu toate acestea adesea sîntem nevoiți să apelăm și la desen, ochiul uman avînd o mai mare acuitate și profunzime comparativ cu cea a filmului sau hîrtiei fotografice. Ochiul uman poate percepe și reda detalii pe care aparatul fotografic nu le sesizează. Ca atare desenul rămîne încă o metodă utilă în procesul instructiv, ca și în domeniul cercetării.

Desenul imaginii percepute prin analiza microscopică a unor preparate poate fi executat „liber" sau cu ajutorul camerei clare (camera lucidă). În primul caz se privește la microscop cu ochiul stîng, iar pe hîrtie se face conturul structurilor analizate. Desenul obținut, ori cît de talentat ar fi executantul său, cuprinde numeroase inexactități, de aceea el are numai o valoare demonstrativă și instructivă.

Desenul fidel al unei imagini microscopice poate fi realizat numai cu ajutorul camerei clare.

Camera clară (lucidă) (fig. 45 și 46) este un instrument optic format, de regulă, dintr-un sistem de prisme (mai adesea două) de sticlă, de

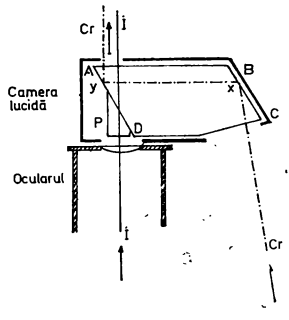


Fig. 45 — Camera clară simplă — I — imaginea preparatului ; Cr — imaginea creionului și a preparatului biologic. A, B, C, D, — prisma de sticlă a camerei clare.

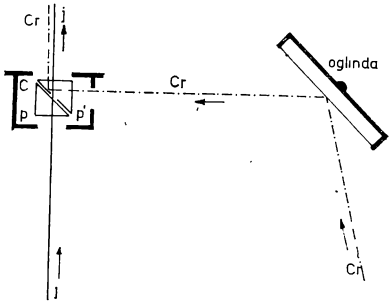


Fig. 46 — Cameră cu oglindă ; i — imaginea preparatului biologic ; Cr — imaginea creionului.

formă paralelipipedică, prinse într-un cadru metalic. La unele tipuri cele două prisme reprezintă fiecare o jumătate de cub secționat diagonal, lipite, formînd un mic cub de sticlă. În afara acestui cub în constituția camerei mai intră, uneori, și o oglindă plană situată lateral, la o distanță de circa 10 cm. Cînd dorim să executăm un desen, fixăm camera clară pe partea superioară a tubului microscopului, prin inelul său metalic, iar prin deplasarea ei pe orizontală se centrează deasupra ocularului. Privind în microscop prin orificiul camerei clare percepem, datorită acesteia, două imagini suprapuse, imaginea preparatului microscopic și imaginea hîrtiei pe care urmează a se efectua desenul. Dacă în cîmpul vizual al camerei clare aducem un creion, putem urmări, cu vîrful său, conturul structurilor biologice din preparat „proiectate" pe coala de hîrtie și astfel obținem desenul fidel al acestora. Pentru a reda cît mai exact în desen imaginea preparatului microscopic este necesar centrarea perfectă a imaginilor și iluminarea egală a acestora. Pe tot parcursul examinării preparatului și executării desenului se recomandă rotirea vizei micrometrice, pentru a avea o imagine cît mai completă asupra structurii analizate.

Desenul realizat în prima formă este un desen „brut" ce urmează a fi ulterior finisat printr-o comparare permanentă cu imaginea microscopică.

Astfel de desene sînt veridice, ca urmare ele pot fi utilizate în ilustrarea manualelor și a lucrărilor științifice.

5.1. NOȚIUNI DE MICROMETRIE

În cercetările de taxonomie datele furnizate de biometrie sînt indispensabile ; dar nu numai taxonomia ci și fiziologia, citologia și multe alte științe biologice apelează la biometrie pentru interpretarea reală a rezultatelor. Ca urmare, cunoașterea exactă a dimensiunilor unei formațiuni biologice este cerută cu acuitate.

Microscopul, prin particularitățile sale tehnice, realizează mărirea obiectului și prin aceasta permite evidențierea unor detalii morfo-anatomice, inaccesibile unei observații libere. Putem cunoaște exact de cîte ori a fost mărită imaginea structurii analizate prin simpla înmulțire a cifrelor indicate pe obiectiv și pe ocular. Un simplu exemplu îl considerăm edificator. Să presupunem că un preparat este analizat cu un obiectiv de 20 X și un ocular de 10 X. În acest caz imaginea percepută de noi, privind prin ocularul microscopului, este mărită de 200 ori ($20 \times 10 = 200$ X).

Aceste date nu sînt însă suficiente; este necesar să cunoaștem exact dimensiunea reală a structurilor biologice analizate. Aceasta este posibil prin utilizarea metodei micrometrice, metodă ce presupune folosirea micrometrului ocular.

Micrometrul ocular este o placă de sticlă de formă circulară, în mijlocul căreia este gravată o linie de 1 mm lungime, împărțită prin linii perpendiculare, echidistante în 100 de părți (fig. 47). Prin urmare, fiecare diviziune reprezintă 1/100 mm (adică este egală cu 10 microni). Pentru numărarea mai ușoară a diviziunilor, gradațiile sînt numerotate din 10 în 10, iar a cincea diviziune este marcată printr-o linie mai lungă.

Micrometrul ocular se introduce în ocular. Fiecare ocular are în porțiunea sa centrală (mijloc) un inel metalic (diafragmă) pe care se fixează micrometrul ocular. Introducerea micrometrului se face prin deșurubarea lentilei superioare (fig. 48).

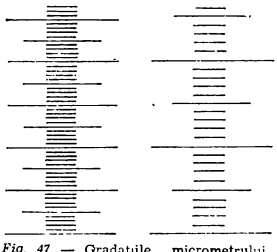


Fig. 47 — Gradațiile micrometrului ocular (stînga) și a micrometrului obiectiv (dreapta).

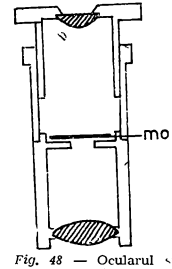


Fig. 48 — Ocularul și poziția micrometrului ocular (mo)

Micrometrul ocular rămîne permanent în ocularul cu care lucrăm. Este însă necesar să cunoaștem exact pentru fiecare combinație de obiectiv-ocular cîți microni reprezintă o diviziune de pe micrometrul ocular. În acest scop trebuie determinat indicele micrometric, ce presupune folosirea micrometrului obiectiv.

Micrometrul obiectiv — este o lamă dreptunghiulară de sticlă, asemănătoare aceleia pe care se montează preparatul, de care se deosebește prin faptul că aceasta are gravată în zona centrală o scală lungă de 1 mm, împărțită prin linii echidistante mai lungi decît cele ale micrometrului ocular în 100 părți. Prin urmare, fiecare diviziune de pe micrometrul obiectiv este egală cu 1/100 mm. A cincea și a zecea diviziune sînt marcate prin linii transversale mai lungi (fig. 47).

Pentru a afla *valoarea indicelui micrometric* (numărul de microni corespunzător unei diviziuni de pe micrometrul ocular) procedăm în felul următor. Introducem micrometrul în ocularul cu care dorim să lucrăm și așezăm micrometrul obiectiv pe platina microscopului. Prin manevre adecvate deplasăm platina microscopului pe orizontală și verticală pînă cînd apare în cîmpul optic scala micrometrului obiectiv, care trebuie să se suprapună exact peste scala micrometrului ocular. În cazul în care cele două scale nu sînt paralele se rotește ocularul pînă se realizează paralelismul respectiv. În acest moment se numără cîte diviziuni ale micrometrului obiectiv se suprapun exact peste cele ale micrometrului ocular. Numărătoarea începe de la o diviziune oarecare pe care ne-o putem alege prin deplasarea laterală a platinei microscopului și implicit a micrometrului obiectiv, diviziune unde are loc suprapunerea exactă a celor două micrometre și se termină cu prima diviziune la nivelul căreia are loc o suprapunere similară (fig. 47). Cunoscînd aceste date putem calcula indicele micrometric cu ajutorul formulei :

$$\text{I.m.} = \frac{\text{n.ob.} \times 10}{\text{n.oc.}}, \text{ în care :}$$

I.m. = indice micrometric ;

n.ob = reprezintă numărul de diviziuni de pe micrometrul obiectiv cuprinse între două diviziuni consecutive ale celor două micrometre ce se suprapun exact ;

n.oc = numărul de diviziuni de pe micrometrul ocular cuprinse între două diviziuni consecutive ale celor două micrometre ce se suprapun exact.

Pentru a înțelege mai bine modul de calculare al indicelui micrometric luăm următorul exemplu. Să presupunem că pentru combinația de obiectiv 20 X și ocular 10 X, valoarea lui n.ob. = 4, iar valoarea lui n.oc. = 9 ; atunci

$$\text{I.m.} = \frac{4 \times 10}{9} = 4{,}44 \text{ microni}$$

Rezultă, așadar, că o diviziune de pe micrometrul ocular este egală cu 4,44 microni. Această valoare este valabilă pentru sistemul optic-ocular 10 X și obiectiv 20 X. Deoarece valoarea în microni a unei diviziuni de pe micrometrul ocular variază în funcție de grosismentul obiectivului și a ocularului este necesar să calculăm indicele micrometric pentru fiecare combinație de obiectiv-ocular. Datele obținute sînt trecute într-un tabel la care să se poată apela ori de cîte ori se fac măsurători biometrice.

Odată calculat indicele micrometric, de micrometrul obiectiv nu mai avem nevoie. **Măsurarea dimensiunilor unei structuri** biologice se face prin suprapunerea peste aceasta a micrometrului ocular. Prin înmulțimea numărului de **diviziuni de pe micrometrul** ocular ce se suprapun exact peste structura analizată și valoarea indicelui micrometric stabilit anterior se află dimensiunea reală în microni a acesteia.

Să presupunem că o celulă, analizată cu obiectivul 20 X și ocular 10 X, măsoară 5 diviziuni ; aceasta înseamnă că dimensiunea ei reală este de 22,2 microni, valoare ce rezultă din produsul numărului de diviziuni (5) cu indicele **micrometric** (4,44) ($5 \times 4,44 = 22,2$ microni).

Acest procedeu de măsurare a dimensiunii structurilor biologice cu ajutorul micrometrului ocular este cel mai exact, cel mai rapid și cel mai indicat în cercetările de biometrie, taxonomie și fiziologie ; nu este însă singurul. Cu ajutorul camerei clare și prin procedeul dublei vederi se poate realiza, de asemenea, măsurarea dimensunilor reale ale structurilor biologice reliefate de imaginile microscopice.

6. FIXATORI ŞI METODE DE FIXARE

6.1. INTRODUCERE ÎN TEHNICA FIXĂRII

Studiul structurii celulei, ţesuturilor şi organelor în starea în care se recoltează nu este posibil, deoarece includerea în parafină, secţionarea şi colorarea, operaţii ce trebuiesc efectuate pentru obţinerea preparatelor microscopice, determină modificări ireversibile ale structurii. Pentru a se menţine structura celulei, specifică fiecărui ţesut, existentă în organismele vii, se impune utilizarea fixatorilor. Soluţiile fixatoare, în afara faptului că au proprietatea de a conserva structura celulei vii, contribuie la realizarea unei colorări selective, de bună calitate şi uniformă.

Soluţiile fixatoare asigură coagularea constituienţilor celulari sau precipitarea lentă şi fracţionată a acestora, evitînd modificarea structurii existente în cadrul celulei vii prin apariţia de artefacte.

Fixarea poate da bune rezultate, numai dacă se respectă următoarele indicaţii :

— materialul biologic ce urmează a fi studiat trebuie fixat în momentul recoltării ;

— piesele să nu fie de dimensiuni mari, pentru a uşura pătrunderea fixatorului. În cazul unor organe sau părţi de organe ce sînt de dimensiuni mari se recomandă fragmentarea lor, în cazul în care prin această operaţie nu se modifică structura şi nu se aduc prejudicii studiului iniţiat ;

— volumul fixatorului să depăşească considerabil volumul materialului, în aşa fel încît acesta să fie sub nivelul fixatorului ;

— timpul de fixare depinde de mărimea şi structura anatomică, de fixatorul utilizat şi de temperatura la care se face fixarea. Aceasta se stabileşte prin tatonări, în funcţie de scopul lucrării. Unele fixări se realizează în condiţii mai bune la temperatura camerei, în timp ce majoritatea dau mai bune rezultate la temperaturi scăzute (0—4°C). Depăşirea timpului poate influenţa negativ calitatea materialului care devine casant, se secţionează cu mare greutate şi nu permite o colorare bună.

Materialul fixat poate fi conservat, pentru un timp îndelungat, în alcool etilic 70° şi la temperatura scăzută, în frigider (0—4°C). Se recomandă păstrarea în sticle sau fiole (eprubete) colorate, ermetic închise pentru a evita evaporarea fixatorului şi deteriorarea materialului.

În momentul folosirii materialului, se recomandă spălarea lui în apă sau alcool, în funcție de fixatorul utilizat și modul de colorare. De pildă, materialul fixat cu fixatori pe bază de acid osmic sau crom va fi spălat, în apă, cel fixat în sublimat, în alcool iodat, iar cel fixat în amestecuri de soluții se va spăla în alcool etilic 70°. În cazul fixatorilor Bouin și Duboscq Brazil, piesele nu se spală ci se trec direct în alcool 97%.

Fixatorul se alege în funcție de scopul urmărit și de colorantul utilizat. De exemplu, pentru studiul cromozomilor cu cele mai bune rezultate se folosesc fixatorii Carnoy, Navasin, Clarck; pentru evidențierea nucleului, materialul biologic se fixează cu unul din fixatorii; 2BD de la Cour, soluție cromo-osmică (Benda), lichidul cromoplatin (Merkel), picroformolul Bouin, etc.

După natura lor chimică, soluțiile fixatoare au fost împărțite de Langeron în patru grupe: *acizi minerali* (acidul osmic, sau tetraoxidul de osmiu, acidul cromic); *săruri metalice* (bicromatul de potasiu, biclorura de mercur sau sublimatul corosiv); *acizi organici* (acidul acetic glacial, acidul triclor acetic, acidul picric); *reducători organici* (alcoolul etilic, formolul etc.).

Chihei, clasică fixatorii după valoarea pH-ului; cu pH=1 (fixatorul Gilson) cu pH=1—3 (fixatorul Flemming, Mann, Bouin, Hermann), cu pH=3 (Altmann, Regaud-Helley).

Cei mai buni fixatori s-au dovedit a fi cei acizi, deoarece ei neutralizează proprietățile reducătoare ale țesuturilor vegetale, favorizînd astfel colorarea. Cele mai bune rezultate se obțin prin combinarea mai multor fixatori. Fixarea se efectuează înainte de includerea țesuturilor în parafină, rășină etc. în vederea secționării lor. Ca urmare o primă cerință este ca fixatorul să nu fie proteolitic. Substanțele care determină ruperea lanțurilor peptidice și radicalilor liberi ai aminoacizilor solubili nu pot fi folosite ca fixatori. Fixatorul trebuie să asigure stabilitatea structurii celulare. Fixatorii se clasifică în două grupe, după reacțiile pe care le dau cu proteinele solubile și anume aditivi și neaditivi. *Fixatorii aditivi* se caracterizează prin eliberarea unor ioni ce se combină chimic cu proteinele celulare, în timp ce *fixatorii neaditivi* (ex. alcoolul etilic) nu au capacitatea de a intra în combinație cu proteinele, astfel încît natura proteinelor este profund modificată. Dintre modificările produse de fixatorii neaditivi cea mai clară este pierderea solubilității și coagularea proteinelor (Anson M. L., 1938; Putnam, 1953). Prin adăugarea unui fixator denaturat la o soluție de albumină, coagularea are loc foarte repede, aproape instantaneu.

Denaturarea proteinelor se realizează în mai multe etape:

— creșterea **reactivității este primul efect**;

— floculareа sau agregarea în particule mici, solubile în acizi slabi și soluții alcaline;

— flocului se unesc într-un cheag care poate fi solubilizat numai cu ajutorul reactivilor care cauzează proteoliza.

Sînt autori care consideră denaturarea orice schimbare la nivelul proteinei, care mărește reactivitatea, dar nu este distorsionată structura (Neurath și colab., 1944). În manual, termenul de denaturare

va fi folosit pentru a indica modificările ce implică relația proteinei cu mediul apos. Cînd o proteină este denaturată, relațiile cu apa sînt într-o anumită măsură, modificate, deși grupările hidrofile asigură menținea stării de sol. Principalele grupări hidrofile din macromolecula proteică sînt $—NH_2$; $—C\begin{matrix}\diagup\!\!\!\diagup O \\ \diagdown OH\end{matrix}$; $—OH$ și $>C{=}O$. La acestea se adaugă grupările reactive prezente în proteina nealterată, în stare latentă și evidențiate prin denaturare sau alte teste ; —SH din molecula cisteinei, —S—S— (cistină), fenil (tirosina) și iodolil (triptofan).

Nu sînt pe deplin elucidate cauzele creșterii reactivității care fac ca proteina să devină accesibilă colorării și acțiunii enzimelor digestive.

Proteinele pot fi denaturate de diferiți factori, căldura fiind frecvent folosită în acest scop deși în absența completă a apei, chiar o temperatură de 100°C nu este eficientă. De asemenea radiațiile ultraviolete și ultrasunetele pot cauza denaturarea proteinelor.

Fixatorii aditivi aderă la substratul care este fixat prin producerea ionilor sau legăturilor covalente. În fixarea proteinelor legăturile se stabilesc de obicei, cu grupările unuia sau mai multor aminoacizi. Fixatorii aditivi sînt uneori coagulați, alteori nu, reacțiile proteinei nefiind alterate profund. De exemplu, fixatorii aditivi pot acționa numai asupra tirosinei și dacă acest aminoacid este prezent foarte rar într-o proteină cei mai mulți dintre aminoacizi manifestă un răspuns corespunzător fiind supuși unor modificări similare celor determinate de fixatorii neaditivi. Aceasta demonstrează că nu poate fi făcută o distincție clară între fixatorii aditivi și neaditivi.

Numărul combinațiilor chimice ce se folosesc ca fixatori este foarte mic. Sînt descriși 7 fixatori puri sau primari care se folosesc în mod frecvent, în stare pură sau în diferite combinații. De cele mai multe ori, pentru eliminarea unor neajunsuri pe care le prezintă unii fixatori în practică, se folosesc combinații de doi sau mai mulți fixatori.

Fixatorii primari pătrund în țesut cu viteze și la nivele diferite. Este de dorit ca un fixator să pătrundă în întregul țesut în mod uniform și într-un timp cît mai scurt pentru ca structura țesutului să fie stabilizată înainte ca autoliza să producă avarii.

Pentru folosirea fixatorilor micști, cu bune rezultate se recomandă să se cunoască rata de penetrație a tuturor componentelor. Pentru realizarea unei fixări de bună calitate componentele unui fixator, trebuie să pătrundă în țesut în același timp. Pentru cunoașterea ratei de penetrație se recomandă folosirea unui gel proteic omogen, în locul unui țesut biologic (B a k e r, 1958). Un gel potrivit pentru acest studiu poate fi obținut prin dizolvarea gelatinei în albuș de ou cald, în concentrație de 15%. Pentru calcularea ratei de penetrație, gelul în stare caldă se toarnă în tuburi de sticlă, după care se introduce cu o extremitate într-un fixator coagulant. Sub acțiunea fixatorului gelul devine alb și opac, datorită coagulării.

Pentru calcularea ratei de penetrație a unui fixator necoagulant tubul cu gel de gelatină — albuș de ou 15% — se introduce cu capătul opus într-un vas cu apă caldă. Gelul fixat rămîne în tub, în timp ce cel nefixat iese din tub. Experiențele efectuate cu $HgCl_2$ au demonstrat că soluțiile fixatoare acționează potrivit legilor difuziunii.

$d = k\,t$; în care d = distanța penetrantă în mm

t = timpul în ore

k = constanta, dependentă de fixatorul folosit în mm parcursă în timpul unei ore, de un fixator în concentrația care determină fixarea proteinelor.

În formă logaritmică ecuația ratei de penetrație se prezintă :

$$\log d = 10\ k + \frac{1}{2}\log t$$

Prin convertirea valorilor d și t, obținute într-un experiment, în logaritm reprezentarea grafică are aspectul unei drepte. În punctul în care linia dreaptă intersectează ordonata, log t devine zero (log t = o) iar log d = 10 k. În felul acesta se poate citi și valoarea k pe ordonată și antilogaritmul figurii obținute este deci k (fig. 49).

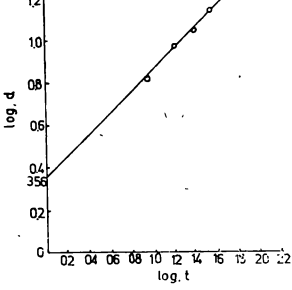


Fig. 49 — Calcularea ratei de penetrație (Baker, 1966)

În cazul $HgCl_2$ rata de penetrație într-un gel de gelatină-albumină este de 2,27. Formaldehida are cea mai mare rată de penetrație (k = 3,6) iar trioxidul de crom are o rată de penetrație mult mai mică (k = 1,19).

Pentru calcularea ratei de penetrație se recomandă de asemenea folosirea unor țesuturi omogene care, prin fixare devin opace și de culoare albă, constituind o indicație sigură a nivelului de penetrație.

Rata de penetrație a diferiților fixatori este mai mică în țesuturi vegetale și animale decît în gel. De exemplu rata de penetrație a $HgCl_2$ în țesutul hepatic este mult mai mică decît în gelul de gelatină-albumină (k = 0,84), probabil datorită lipidelor din membranele celulare. Avînd o rată de penetrație de 0,84 $HgCl_2$ pătrunde în țesutul hepatic pe o distanță de 20μ ce reprezintă diametrul unei celule hepatice de dimensiuni mari, în numai 3 secunde. Se apreciază că pen-

tru a pătrunde într-un țesut hepatic în grosime de 36 mm sînt necesare 77 zile. Din acest exemplu se poate trage concluzia că pentru realizarea unei fixări de calitate superioară materialul biologic (țesut, organ) trebuie să fie de dimensiuni reduse pentru ca fixatorul să pătrundă în întregul material, într-un timp foarte scurt (fig. 50).

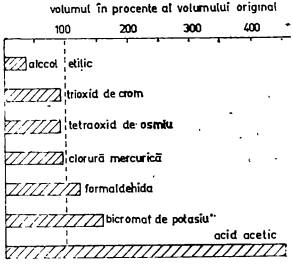


Fig. 50 — Diagrama ce indică modificarea volumului unui gel de gelatină-albumină, după 18 ore de acțiune a unor fixatori primari (Baker, 1966)

Pentru studii de microscopie fotonică se recomandă ca materialul să fie fixat timp de 3—6 ore și să se folosească fixatorul adecvat. Cu cele mai bune rezultate se folosesc fixatorii : Zenker, Helly (pentru ciuperci în special), Carnoy, Navașin. În microscopia electronică frecvent se folosesc tetraoxidul de osmiu (OsO_4), glutaraldehida și $KMnO_4$. Piesele în grosime de 1 mm pot fi fixate într-un timp ce variază între 30—120 minute.

În timpul fixării pot apărea diferite modificări ale structurii datorită diferitelor constituienți ai fixatorului. Artefactele rezultate în urma fixării au fost grupate în două categorii : artefacte extrinseci și artefacte intrinseci (Baker, 1969).

Artefactele extrinseci — iau naștere prin depozitarea în țesutul fixat a unor componente ale fixatorului. De exemplu în țesutul fixat de $HgCl_2$ pot apare granule negre. Aceste artefacte pot fi evitate sau îndepărtate prin folosirea unor solvenți speciali.

Artefactele intrinseci — constă în deformarea structurii componenților tisulari. Cele mai profunde modificări ale structurii celulei sînt determinate de fixatori coagulanți. Sub acțiunea acestor fixatori are loc contractarea neregulată a celulei, iar citoplasma este transformată într-un coagulum consistent. În celule se formează o rețea, în ochiurile căreia se depozitează fixatorul. Dimensiunile rețelei depind de natura fixatorului. Dacă se folosește un fixator coagulant latent în secțiunile foarte subțiri colorate cu hematoxilină ferică se evidențiază clar spațiile pe care le formează rețeaua.

Cu excepția nucleului, nucleoluiui și centriolului, ceilalți constituienți celulari se dezorganizează sub influența fixatorilor coagulanți. ADN se prezintă sub forma unui precipitat dispersat neregulat și fixat

pe fibrele rețelei și pe membrana internă a nucleului. Regiunile heterocromatice sînt puternic colorate și vizibile în interfază (fig. 51).

Fixatorii necoagulanți, în special tetraoxidul de osmiu și formaldehida, determină mult mai puține modificări în structura celulei decît fixatorii coagulanți.

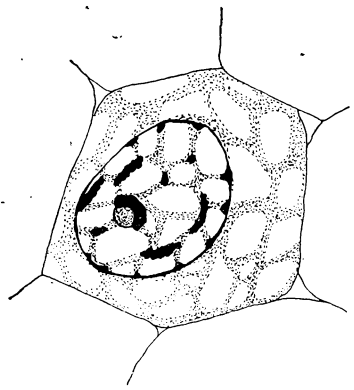


Fig. 51 — Reprezentarea schematică a structurii celulei după fixare cu fixatori coagulanți și colorare specifică (Baker, 1966).

Includerea în parafină cauzează de asemenea o serie de distorsiuni ale macromoleculelor proteice.

Un fixator ideal trebuie să mențină constant volumul țesutului sau organului și nealterați constituienții celulari. Cei mai mulți fixatori determină construcția țesutului tratat sau modifică volumul acestuia. De exemplu acidul acetic determină o umflare puternică a țesutului, fiind inclus în componența multor fixatori. Cei mai mulți dintre fixatorii primari nu modifică volumul gelului cu excepția alcoolului etilic care determină micșorarea. Volumul țesuturilor și organelor poate fi calculat prin metode adecvate, la începutul, sfîrșitul și în diferite etape ale fixării. Se recomandă folosirea unor porțiuni din țesuturi sau organe în formă cubică sau sferică. Pentru studiul celulei se recomandă folosirea celulelor de *Saccharomyces* sp., *Chlamydomonas* sp.

Pentru ca volumul celulei sau a țesutului viu să nu sufere modificări accentuate, se practică adăugarea de săruri indiferente sau nefixative la fixatori sau țesutul secționat se păstrează într-o soluție salină izotonică.

Piesele mici se fixează prin imersionarea în soluția fixatoare, celulele țesutului fiind supuse în același timp acțiunii fixatorului. Piesele mari se pot fixa prin injectare. Se recomandă să se acorde o atenție

specială fixării materialului. Dacă o piesă este secționată și scoasă în afara organismului poate avea loc o alterare a structurii. Secționarea este însoțită de o pierdere a apei prin evaporare sau scurgere. Introducerea țesutului într-un lichid hipotonic determină o creștere a volumului, datorită diferențelor de concentrație.

Se recomandă ca prelevarea unui țesut să se facă într-un lichid care nu modifică volumul, nu dizolvă și nu distruge constituienții celulari, dar care va omorî bacteriile și ciupercile. Un astfel de lichid constituie un mijloc de protecție și în același timp va conferi țesutului rezistența necesară pentru incluđere, secționare și montare.

Nu toți constituienții celulari necesită fixarea; de pildă chitina, celuloza, scleroproteinele, granulele de amidon, unele cristale anorganice — fiind constituienți stabili își păstrează forma și în absența fixării. Alte substanțe, cum este zahărul, nu pot fi reținute în locul de acumulare; glicogenul este singurul hidrat de carbon solubil care în mod frecvent este reținut și observat în preparatele microscopice. Sînt fixatori care nu au efect asupra lipidelor, neputînd fi izolate din țesutul viu, fără a afecta structura celulei.

Fixarea poate fi realizată și prin căldură, dar se folosește foarte rar. Deși căldura are tendința de a provoca distorsiunea, are avantajul că întregul conținut rămîne în interiorul celulei.

6.2. PROPRIETĂȚILE FIZICO-CHIMICE ALE UNOR FIXATORI CITOLOGICI

Din multitudinea soluțiilor fixatoare utilizate în laboratoarele de citologie am selectat cîteva din cele mai uzuale cărora le vom prezenta principalele proprietăți fizico-chimice. Baker (1969) clasifică fixatorii primari în *coagulanți* și *necoagulanți*.

6.2.1. FIXATORI PRIMARI COAGULANȚI

Alcoolul etilic (C_2H_5OH)

Alcoolul etilic este un lichid incolor, cu un miros caracteristic, miscibil cu apa în orice proporție. Prezintă un potențial de oxidare scăzut (alcool etilic 95%, 0,045 volți). Punctul de topire este de 117°C, iar punctul de fierbere 79°C.

Constituie un fixator neaditiv sau coagulant, denaturant al multor proteine. Nu coagulează zeina, gliadina sau nucleoproteinele. Precipită acizii nucleici, dar nu-i fixează. Alcoolul etilic este un agent care se folosește și pentru evidențierea lipidelor.

Lipidele nu sînt modificate chimic, nu sînt fixate, avînd tendința de a se topi și dizolva.

Tripalmitina și tristearina sînt insolubile în alcool etilic rece. Trioleina, lecitina și acidul oleic sînt solubile în alcool etilic. Alcoolul etilic precipită glicogenul, fără a-l fixa. Rata de penetrație este moderată. Alcoolul etilic prezintă o pronunțată tendință de contractare a țesutului și determină o întărire excesivă. Produce o coagulare de calitate inferioară a citoplasmei și nucleului și distruge mitocondria.

Secțiunile obținute din materialul biologic incluzionat în parafină au celulele separate unele de altele ; citoplasma se condensează în mase izolate ce se deplasează și se localizează pe membrana celulară de pe partea opusă a celei supusă acțiunii fixatorului. În aceste secțiuni, lipidele nu sînt prezente, iar cromozomii nu se evidențiază.

Majoritatea fixatorilor modifică aciditatea și alcalinitatea țesuturilor fixate, deoarece reacționează cu grupările acide sau bazice ale unor aminoacizi, iar ulterior le blochează. Alcoolul etilic nu atacă grupările laterale ale proteinelor și nu modifică reacțiile proteinei, iar afinitatea lor pentru coloranții bazici sau acizi nu se schimbă. Nucleoproteinele pot fi dizolvate și nu au o poziție stabilă în celulă, alcoolul etilic fiind un fixator foarte slab pentru nuclei și cromozomi.

Alcoolul etilic este compatibil cu clorura mercurică, formaldehida și acidul acetic. Deoarece acesta are tendința să fie oxidat de la aldehidă la acid acetic, se recomandă să nu fie amestecat cu trioxidul de crom, bicromatul de potasiu și tetraoxidul de osmiu.

Clorura mercurică ($HgCl_2$)

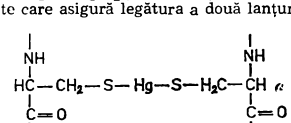
Este o substanță incoloră ce se prezintă sub forma unor cristale aciculare. Concentrația standard constă în soluție saturată în apă distilată. Sublimează ușor. Solubilitatea în apă este de aproximativ 7%. Este de asemenea solubilă în alcool etilic și benzen. Ionizează numai parțial. Prin hidroliză dă $(HgCl_4)H^{++}$, ioni de hidrogen (pH soluției standard este aproximativ 3,2) și alți ioni.

Este un puternic oxidant, potențialul de oxidare fiind de aproximativ 0,76 volți.

În reacțiile cu proteinele se comportă ca un fixator coagulant aditiv. Reacțiile depind de pH la care fixatorul este folosit.

Clorura mercurică este în general folosită la un pH inferior punctului izoelectric al proteinelor. În mod constant grupările — HN_2 din molecula amioacizilor sînt ionizate la $—^+NH_3$ și vor fi atrase electrostatic între gruparea încărcată pozitiv și ionul negativ $(HgCl_4)^-$.

Mercurul sub forma de ion poate asigura astfel legarea a două lanțuri proteice. De exemplu, $HgCl_2$ poate reacționa cu cisteina din proteine și formează o punte care asigură legătura a două lanțuri proteice (fig. 52).



Reacția poate fi grăbită în prezența NaCl deoarece prin adăugarea unor cloruri crește cantitatea ionului respectiv.

Clorura mercurică nu coagulează soluțiile nucleoproteice. Se produce flocularea dar nu determină formarea de cheag. Acizii nucleici precipită slab sub acțiunea $HgCl_2$. Clorura mercurică acționează trigliceridele.

Formează compuși cu fosfolipidele, deși nu a fost studiată solubilitatea $HgCl_2$ în soluții lipidice.

$HgCl_2$ prezintă o rată de penetrație moderată (k = 2,2). În țesuturi se formează partciule negre, cu diametrul de cîțiva μ, constituite din mercur metalic. Aceste particule pot fi izolate de iodine în soluție alcoolică, probabil prin formarea de iodină mercurică. Iodina mercurică colorează țesutul dar acesta poate fi remediat prin injectarea de alcool etilic 70% sau tiosulfat de sodiu. $HgCl_2$ menține forma celulei. Citoplasma și nucleul sînt fragmentați și pînă la urmă coagulați, cromozomii nu sînt fixați. Nu afectează structura mitocondriei. Prin secționarea materialului fixat în $HgCl_2$ și incluzionat în parafină se observă că citoplasma se contractă și celulele tind să se separe una de alta.

Prin fixare cu $HgCl_2$, proteinele sînt mult mai repede colorate cu coloranți bazici, decît în cazul folosirii altor fixatori. Afinitatea specială pentru coloranții bazici trebuie atribuită în parte coagulării lanțurilor proteice într-o formă care permite ionilor colorantului să pătrundă ușor în țesut și celule. Manifestă, de asemenea, o anumită afinitate pentru coloranții acizi, ceea ce presupune că grupările amino din proteine nu sînt complet blocate. Se presupune că grupările —COOH din aminoacizi rămîn intacte.

Clorura de mercur nu afectează structura fină a celulei. În secțiunile ultrafine observate la microscopul electronic pot fi observați reticulul endoplasmic neted și rugos. Conservă, de asemenea, foarte bine structura membranelor învelișului nuclear și mitocondrial.

Clorura de mercur este compatibilă cu oricare din fixatorii primari.

Trioxidul de crom (CrO_3)

Trioxidul de crom se prezintă sub forma unor cristale brun roșii avînd o solubilitate mare în apă. Soluția standard conține aproximativ 62 g în 100 g solvent (62 w/W). Concentrația standard conține 0,5 g în 100 ml apă distilată. În apă formează acid cromic (H_2CrO_4) care nu poate fi izolat. O mică cantitate rămîne nedisociată în apă. Cea mai mare parte din CrO_3 ionizează ca bicromat (Cr_2O_7), iar restul sub formă de cromat de hidrogen $(HCrO_4)^-$.

CrO_3 prezintă cel mai mare potențial de oxidare, fiind de 1,1 volți. ionul bicromat este redus la ionul cromic (Cr^{+++}) sau la oxidul cromic (Cr_2O_3).

Trioxidul de crom coagulează puternic cu albumina și multe alte proteine, inclusiv nucleoproteinele. CrO_3 nu fixează gelul de gelatină. Se presupune că trioxidul de crom este un fixator aditiv, deși nu sînt elucidate reacțiile care sînt implicate în procesul de fixare.

Afinitatea proteinelor pentru coloranții bazici este scăzută după fixare cu CrO_3, datorită probabil blocării grupării —COOH din molecula aminoacizilor. Aceasta sugerează ideea că proteinele acide nu sînt fixate, fiind dizolvate.

CrO_3, precipită ADN, care devine insolubil. Grăsimile devin insolubile în solvenții lipidici printr-un tratament prelungit cu CrO_3, deși se apreciază că perioada normală de fixare nu dă rezultate satisfăcătoare.

Polizaharidele sînt convertite la aldehide prin oxidare, putînd fi

astfel puse în evidență printr-un test de colorare, specific aldehidelor.

Nu se cunoaște precis dacă CrO_3 fixează glicogenul. Rata de penetrație a CrO_3 este lentă ($k = 1,12$).

CrO_3 determină o ușoară micșorare a gelului de gelatină și o întărire moderată. CrO_3 este în mod obișnuit spălat cu apă de robinet.

Dacă în țesut rămîne o cantitate mică de CrO_3 liber acesta poate fi redus la oxid cromic (Cr_2O_3) de culoare verde, cu ajutorul alcoolului sau a altor agenți reducători.

Oxidul cromic este insolubil în solvenți obișnuiți și rezistă la acizi sau alți reactivi, fiind îndepărtat din țesut cu dificultate.

CrO_3 determină o coagulare de calitate inferioară a citoplasmei în timp ce nucleul și cromozomii sînt foarte bine conservați.

În secțiunile obținute din materialul incluzionat în parafină constituenții celulari sînt bine fixați cu toate că nucleul este transformat într-un coagulum. Cromozomii și nucleolul se evidențiază bine, în schimb mitocondriile și picăturile lipidice nu pot fi identificate, Citoplasma, fixată cu oxidul cromic, prezintă o puternică afinitate pentru coloranții acizi.

Oxidul cromic poate fi amestecat cu clorura mercurică, tetraoxid de osmiu, acid acetic. Se recomandă ca trioxidul de crom să nu fie amestecat cu reducători, cum sînt alcoolul etilic sau formaldehida. Se cunosc însă puțini fixatori care conțin trioxid de crom și formaldehidă (B a k e r, 1969).

6.2.2. FIXATORI PRIMARI NECOAGULANȚI

Fixatorii primari necoagulanți constituie un grup heterogen. Formoldehida și tetraoxidul de osmiu sînt fixatori necoagulanți aditivi care determină întărirea gelului de proteină, fără a elimina apa și fixează protoplasma.

Bicromatul de potasiu și acidul acetic nu au capacitatea de a fixa proteinele simple. Bicromatul de potasiu acționează asupra lipidelor simple și determină o umflare a țesutului, contracarînd acțiunea altor reactivi folosiți pentru fixare sau includere.

Acidul acetic (CH_3—COOH)

Acidul acetic este un lichid incolor, cu miros caracteristic înțepător, miscibil în orice proporție cu apa, alcoolul etilic, eterul și cloroformul.

Acidul acetic nediluat este denumit glacial deoarece poate fi ușor înghețat; conține 99,8% substanță activă, iar prin răcire formează cristale. Cristalele obținute prin răcire se topesc la 16,6°C. Concentrația standard este de 5% v/V în soluție apoasă. Acidul acetic cristalizează la 16,6°C și fierbe la 118°C; este un acid slab (pH la concentrația standard este de aproximativ 2,3), se oxidează prin reducerea cu formare de aldehidă acetică (p.O = 0,77 v).

Majoritatea proteinelor nu sînt coagulate sau gelificate de către acidul acetic. Nucleoproteinele și ADN din soluție sînt precipitate. Acidul acetic nu este aditiv și extrage histonele din țesuturi. Unele lipide cum sînt colesterolul și sfingomielina sînt solubile în acid acetic.

La concentrația la care este folosit pentru fixarea țesutului, acidul acetic nu este solvent lipidic. De asemenea, nu fixează și nu distruge hidrații de carbon și lipidele.

Acidul acetic pătrunde în țesuturi rapid (k = 2,75); are proprietatea de a determina umflarea gelurilor proteice și a țesutului, anulînd contractarea produsă de alte substanțe folosite, fiind component a numeroase amestecuri fixatoare. Gelul de albumină își mărește de 4—5 ori volumul inițial în decursul a 18 ore. Umflarea țesutului se datorește faptului că proteinele nu sînt coagulate.

Țesuturile fixate cu acid acetic rămîn moi, fiind ușor de secționat.

Deoarece acidul acetic nu provoacă artefacte extrinseci și este solubil cu alcoolul etilic, în orice proporție, nu este necesară spălarea țesuturilor.

Acidul acetic conservă bine forma celulelor și organitelor citoplasmatice cu excepția mitocondriei și nucleului. Mitocondriile și aparatul Golgi devin mai puțin vizibile sau pot fi distruse. Conținutul nucleului se transformă într-o rețea grosieră iar nucleolul își mărește volumul. Cromozomii sînt bine fixați. Celulele se unesc în agregate, separate între ele prin spații de dimensiuni variate. Uneori citoplasma devine reticulară sau se grupează în jurul nucleului.

Ionul acetat determină efecte caracteristice de fixare la pH = 4. La un pH mai scăzut nu se produce fixarea și țesutul se macerează.

Citoplasma se colorează intens cu coloranți acizi și slab cu coloranții bazici. Cromatina nucleilor interfazici se colorează slab în timp ce cromozomii metafazici și anafazici se colorează intens cu coloranți bazici.

Acidul acetic este compatibil cu toți fixatorii. Bicromatul de potasiu amestecat cu acid acetic are o acțiune similară trioxidului de crom, cu excepția situației în care acidul acetic este în cantitate mică.

Bicromat de potasiu ($K_2Cr_2O_7$)

Bicromatul de potasiu se prezintă sub forma unor cristale de culoare oranj—roșu, cu o solubilitate de aproximativ 10% w/v, în apă. Concentrația standard este de 1,5% w/v în soluție apoasă.

Ionii produși în soluție de $K_2Cr_2O_7$ sînt asemănători cu cei produși de trioxidul de crom, dar în proporții diferite. Soluția de bicromat de potasiu conține o cantitate mai mică de ioni de hidrogen, pH soluției standard fiind de aproximativ 4,1. Ionul principal este ionul bicromat (Cr_2O_7) cu mici cantități de acid cromic ($HCrO_4$). Bicromatul de potasiu este un oxidant puternic; nu coagulează proteinele și nucleoproteinele. Albușul de ou este transformat treptat sub acțiunea $K_2Cr_2O_7$, într-o masă vîscoasă într-un gel slab. Histonele sînt gelificate cel mai intens. Gelul de gelatină poate fi insolubilizat în apă caldă sub influența bicromatului de potasiu, în condiții de lumină intensă. Proteinele reacționează diferit față de anionii de crom, în raport cu pH. La pH = 3,4 anionii de crom, coagulează proteinele, în timp ce la valori ale pH mai mari de 3,8 nu are loc acest proces.

Bicromatul de potasiu acționează asemănător trioxidului de crom, cu condiția ca pH să fie mai mic de 3,4. Bicromatul de potasiu este

folosit în special pentru proprietatea de a fixa anumite lipide. Grăsimile din țesuturile adipoase devin insolubile în solvenți lipidici, prin tratarea un timp prelungit cu soluție de bicromat de potasiu. Lipidele nesaturate sînt oxidate la nivelul dublelor legături. Lipidele care au o legătură dublă în apropierea acidului gras și situată la distanță de gruparea carboxilică are tendința de polimerizare în condiți de oxidare, proces însoțit de scăderea solubilizării în solvenți lipidici. Prin reținerea cromului din soluția de bicromat de potasiu, lipidele devin insolubile în solvenți lipidici. În mod deosebit fosfolipidele reține cromul în timpul post-cromatizării, care se folosește în mod frecvent și care constă în introducerea țesutului într-o soluție de bicromat de potasiu 5%, timp de 24 ore, la temperatura de 24°C. S-a constatat că fosfolipidele naturale sînt nesaturate, iar fosfolipidele sintetice, cum este dipalmitoilul de lecitină, sînt saturate și reține crom.

Deoarece proteinele nu sînt coagulate sau gelificate, rata de penetrație nu poate fi determinată prin metodele folosite în cazul altor fixatori. Gelul de gelatină-albumină își mărește volumul prin introducerea într-o soluție de bicromat de potasiu.

Bicromatul de potasiu nu produce întărirea țesutului, acesta menținîndu-și starea inițială.

Pentru a evita precipitarea oxidului de crom insolubil (Cr_2O_3) prin reducerea cu alcool etilic, țesutul fixat cu K_2Cr_2O, se spală cu apă de robinet în jet continuu. În absența luminii procesul de reducere nu are loc.

Bicromatul de potasiu păstrează aspectul normal al țesutului. Mitocondriile se conservă bine, cu excepția celor filamentoase care devin ovale. Sucul nuclear devine fin granular. Nucleolul se contractă datorită probabil pierderii de ARN.

În țesutul inclus în parafină, celulele se grupează în agregate, separate prin spații. Citoplasma, deși omogenă, se strînge în jurul nucleului. Bicromatul de potasiu nu exercită nici o acțiune fixatoare asupra cromozomilor și regiunilor heterocromatice din nucleu. Dacă fixarea se face la un pH mai mic de 3,4, bicromatul de potasiu are o acțiune similară trioxidului de crom.

Bicromatul de potasiu nu dă rezultate bune în microscopia electronică. Citoplasma se coagulează și menține nucleul în poziția sa inițială, iar celelalte organite celulare nu se pun în evidență. Din această cauză bicromatul de potasiu se folosește în amestec cu alte substanțe chimice fixatoare. În special bicromatul de potasiu se folosește în post-cromatizare, după fixare datorită acțiunii pe care o are asupra lipidelor nesaturate.

Formaldehida (HCHO)

Formaldehida este un gaz incolor, foarte solubil în apă $HO(H_2CO)H$. Monomerul $HO(H_2CO)H$ predomină în concentrația standard, care este de 1 g la 100 ml apă (4% w/v).

Formalina (formolul) este un amestec de aldehidă formică, un hidrat, $H—HC(OH)_2$ și polimeri hidratați $(H—CH_2O)_2—OH)$.

Formolul este o soluție de 30—40% și conține și puțin metanol (H—CHO). Prin evaporarea formolului în vid rezultă paraformaldehida

$(CH_2O)_2\ H_2O$, în care n = 10—15 sau mai mult. Paraformadelhida are tendința de a forma un precipitat alb.

Formaldehida ionizează, producînd o cantitate neglijabilă de ioni de hidrogen. Oxigenul atmosferic oxidează ușor formolul la acid formic.

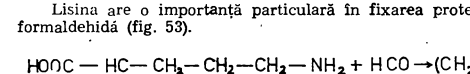
Soluția standard, care se prepară prin diluarea formolului în apă distilată, are pH = 4. Dacă carbonatul de calciu este prezent în exces pH = 6,4, formaldehida poate fi redusă de metanol și astfel poate acționa ca agent oxidant. Potențialul de oxidare este scăzut fiind de 0,23 volți.

Reacțiile formaldehidei cu proteinele au fost studiate avînd importanță industrială. Pentru aceste studii s-au folosit polipeptide constituite dintr-un singur aminoacid, care se repetă de un anumit număr de ori.

Astfel,s-a experimentat cu poliglicina, polipeptidă artificială fără importanță, cu acid poliglutamic și cu fibrile de mătase — constituite din alanină și tirozină și s-a dovedit că acestea leagă foarte puțin formaldehida. Poliglutamina — în contrast cu poliglicina, acidul glutamic și fibrilele de mătase, leagă o cantitate mai mare de formaldehidă (F r a e n k e l-C o n r a t și colab. 1945).

Observațiile efectuate au dovedit că formaldehida se leagă de poliglutamină prin grupurea —HH_2, care este înlocuit de —OH. Aceste proteine desaminate leagă o cantitate redusă de formaldehidă.

Lisina are o importanță particulară în fixarea proteinelor de către formaldehidă (fig. 53).



Grupul OH arată că această ecuație este reactivă și între două lanțuri proteice se formează un pod metilen (—CH_2—), fiecare posedă un grup amino —NH—CH_2—NH—.

Formaldehida nu coagulează nucleoproteinele și nu precipită ADN din soluție. Multe lipide sînt bine conservate de formaldehidă, deși nu este necesară fixarea lor. Trigliceridele și colesterolul, de exemplu, nu sînt dizolvate. Formaldehida fixează lipidele din țesuturile adipoase, în locul lor de depozitare. Fosfolipidele sînt slab dizolvate de formaldehidă.

Formaldehida poate, de asemenea, reacționa cu lipidele nesaturate prin legăturile duble din lanțurile acizilor grași.

În această reacție, formaldehida acționează ca un agent de oxidare.

Formaldehida fixează glicogenul care adeseori se găsește în relație intimă cu proteinele ; este component de bază al fixatorilor folosiți pentru evidențierea glicogenului ; are o rată de penetrație mare, k = 3,6 ; determină o ușoară umflare a gelului de gelatină-albumină și o întărire accentuată ; forma celulei este bine conservată. În regiunea

citopalsmei expusă acțiunii formaldehidei apare tendința de a se forma mici bule de aer și granule foarte fine. Mitocondria și picăturile de lipide sînt în general foarte bine conservate. Nucleul se conservă în starea lui inițială. Nu este necesară o spălare specială a țesuturilor fixate cu formaldehidă, deoarece este foarte solubilă în apă și alcool etilic.

În secțiunile efectuate după includerea materialului în parafină agregatele celulare sînt separate prin spații largi, iar citoplasma se strînge în regiunea nucleului. Majoritatea picăturilor de lipide sînt dizolvate. Nucleul interfazic este bine conservat, în schimb cromozomii nu sînt fixați în bune condițiuni. Proteinele fixate cu formaldehidă se colorează cu coloranți bazici. Această afinitate pentru coloranții bazici se datorește faptului că grupările acide ale proteinelor nu sînt afectate de formaldehidă. Grupările bazice ale proteinelor sînt blocate de formaldehidă, care reduce afinitatea pentru coloranții acizi. Afinitatea pentru coloranții acizi nu este afectată în întregime deoarece reacțiile dintre proteine și formaldehidă se desfășoară în ritm lent și proteinele nu au posibilitatea să înglobeze întreaga cantitate de formaldehidă.

Formaldehida este unul din cei mai utilizați fixatori în studiile de microscopie electronic. Țesuturile fixate cu formaldehidă filtrează mult mai ușor electronii comparativ cu cele fixate cu acetat de uranil și permanganat de potasiu.

Formaldehida este compatibilă cu clorura mercurică și acidul acetic; reduce lent tetraoxidul de osmiu și bicromatul de potasiu și rapid hidroxidul de crom.

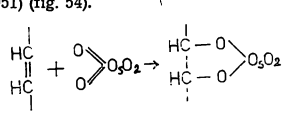
Tetraoxidul de osmiu (OsO_4)

Tetraoxidul de osmiu se prezintă sub forma unor cristale galben-pal, solubile în apă în concentrație de aproximativ 7% (7% w/W). În tetraclorură de carbon solubilitatea este de 375% w/W. Concentrația standard este de 1% w/v în soluție apoasă. Cristalele de OsO_4 se topesc la 41° și încep să sublimeze la o temperatură mult mai scăzută. Gazul emanat atacă mucoasele ochiului, nasului și gurii.

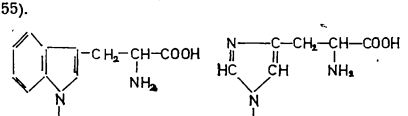
În soluție tetraoxidul de osmiu acceptă o moleculă de apă și devine persomat de hidrogen (H_2OsO_5). Ionizează într-un minut și produce ioni de hidrogen și $HOsO_5$. Acidul osmic (H_2OsO_4) nu se folosește ca fixator.

Tetraoxidul de osmiu este un oxidant moderat. O soluție de tetraoxid de osmiu 25% are potențialul de oxidare de 0,64 volți. În procesul de reducere este pierdut dioxidul de osmiu hidratat, de culoare maro sau negru ($OsO_2\ 2H_2O$).

OsO_4 nu coagulează soluția de albumină și nucleoproteinele. OsO_4 este un fixator aditiv avînd capacitatea să reacționeze simultan la ambele capete ale dublelor legături prezente în moleculele multor substanțe organice (B i r d, 1951) (fig. 54).

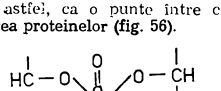


Cele mai multe combinații ale osmiului sub formă de tetraoxid de exemplu, sînt închise la culoare sau se colorează în negru-uniform, fiind un criteriu de identifcare a substanțelor care reacționează cel mai puternic cu OsO_4, formînd precipitate de culoare închisă. După cum este cunoscut acești aminoacizi conțin legături duble cu care reacționează OsO_4 (fig. 55).



Proteinele care conțin o proporție ridicată de triptofan sau histidină au o reactivitate particulară cu OsO_4 fiind o corelație directă între conținutul în triptofan și capacitatea proteinei de a forma soluții apoase și de a fi gelificată de către OsO_4 (Porter și Kalman, 1953).

Osmiu acționează astfel, ca o punte între cele două componente proteice și asigură fixarea proteinelor (fig. 56).



Triptofanul și histidina nu sînt singurii aminoacizi liberi care formează în contact cu OsO_4, un precipitat. Cisteina, de exemplu se comportă asemănător, deși molecula ei nu posedă duble legături.

Baker (1964) consideră că triptofanul și histidina au un rol important în colorarea proteinelor din țesuturi și evidențiază faptul că proteinele fixate cu OsO_4 blochează gruparea NH_2 din aminoacizii bazici, în special din lisină, deși nu este încă elucidat mecanismul blocării. Unele proteine care conțin o cantitate mai mare de lisină și arginină, prin fixarea cu OsO_4 se închid la culoare, în schimb protaminele care conțin o cantitate ridicată de arginină se colorează foarte puțin, la temperatura camerei.

Din această succintă prezentare se poate trage concluzia că OsO_4 nu determină totodeauna colorarea țesuturilor, ca o consecință a reacției între OsO_4 și proteinele celulare.

Tetraoxidul de osmiu nu precipită ADN din soluție.

Tetraoxidul de osmiu înegrește toate categoriile de lipide nesaturate și nu acționează asupra celor saturate — ceea ce se presupune că acționează la nivelul dublelor legături.

Tetraoxidul de osmiu este solubil în lipide și poate pătrunde în lipidele saturate. Prin introducerea țesutului în alcool etilic, tetraoxidul de osmiu este redus la bioxid de osmiu, de culoare neagră. Nu a fost elucidată cauza înegririi mult mai lentă a lipidelor conjugate cu toate

că în mod obișnuit au un grad mai ridicat de nesaturare decît amestecurile de trigliceride.

Dacă înainte de includere se folosesc soluții adecvate, cum sînt benzenul și cloroformul, țesutul fixat cu tetraoxidul de osmiu poate fi inclus în parafină fără riscul de pierdere a lipidelor nesaturate.

În cazul în care lipidele nesaturate sînt înnegrite de tetraoxidul de osmiu, lipidele eliberate sînt solubile în soluții lipidice, cum sînt benzenul și cloroformul.

După fixarea țesuturilor cu OsO_4 componenta saturată a particulei lipidice poate fi dizolvată în timpul deshidratării și includerii. În condiții obișnuite de fixare OsO_4 nu reacționează cu hidrații de carbon.

Rata de penetrație nu este constatată. Astfel, în primele 16 ore de la includerea țesutului în OsO_4 rata de penetrație este de 1,0, după 16—144 ore valoarea lui k scade la 0,31.

Volumul țesutului fixat cu OsO_4 suferă modificări lente. Gelul de gelatină-albumină se contractă ușor. Țesutul supus acțiunii OsO_4 rămîne moale. Tetraoxidul de osmiu se spală cu apă de robinet pentru a împiedica reducerea ulterioară, datorită alcoolului etilic. Pentru studii de mircoscopie electronică, țesutul poate fi trecut direct din fixator în alcool etilic 50 sau 70%.

Tetraoxidul de osmiu conservă în condiții bune structura celulei vii fiind unul din cei mai buni fixatori.

Țesutul fixat cu tetraoxidul de osmiu și inclus în parafină suferă distorsiuni. Celulele se unesc în agregate care se contractă, iar între ele apar spații de dimensiuni diferite. Citoplasma se contractă în jurul nucleilor. Cromozomii, în special în prima fază meiotică sînt slab fixați.

Coloranții acizi acționează foarte superficial asupra țesutului fixat cu teraoxid de osmiu, în timp ce coloranții bazici sînt absorbiți de sucul nuclear și citoplasmă. Din această cauză nu este posibil să se obțină o colorare diferențiată.

În microscopia electronică OsO_4 se folosește pentru evidențierea structurii fine a citoplasmei și a organitelor celulare. Fiind cunoscută eficiența formaldehidei în fixarea țesutului ce urmează să fie examinat la microscopul fotonic sau electronic, se recomandă efectuarea unei fixări duble. Prima fixare se realizează cu formaldehidă, iar a doua cu OsO_4 aceasta fiind denumită post-osmificare.

Tetraoxidul de osmiu reacționează cu alcoolul etilic și formaldehida și este compatibil cu clorura mercurică, trioxidul de crom și bicromatul de potasiu. Clorura mercurică, bicromatul de potasiu și trioxidul de crom împiedică reducerea tetraoxidului de osmiu, în prezența luminii.

6.3. TEHNICI DE PREPARARE ȘI UTILIZARE A FIXATORILOR CITOLOGICI

Formaldehida și teraoxidul de osmiu, sînt singurii fixatori primari care sînt folosiți ca atare, fiind numiți și fixatori simpli. Marea majoritate a soluțiilor fixatoare, folosite în studiile de citologie, histologie, embriologie vegetală sau animală, sînt constituite din două sau mai multe substanțe chimice, combinate în diferite proporții. La realizarea

amestecurilor fixatoare s-au luat în considerație proprietățile fizico-chimice ale fiecărei substanțe, urmărindu-se ca printr-o acțiune complementară să fie eliminate neajunsurile pe care le prezintă componenții fixatorului.

Baker (1969) clasifică amestecurile fixatoare în patru grupe:

grupa I — cuprinde soluțiile fixatoare care conțin o substanță coagulantă și acid acetic (Clarke, Zenker, etc.). Se folosesc în studiile de anatomie și histologie.

grupa a II-a — cuprinde amestecurile fixatoare care conțin substanțe necoagulante și acid acetic. Se folosesc în studii de histologie, citologie și în special pentru studiul cromozomilor (Flemming, Allen, Bouin etc.).

grupa a III-a — amestecurile fixatoare încadrate în această grupă conțin substanțe coagulante și necoagulante și se folosesc pentru evidențierea organitelor citoplasmatice (Helly, Champy, Flemming — fără acid acetic, Mann, Zenker — fără acid acetic).

grupa a IV-a — cuprinde fixatori necoagulanți simpli și se folosesc pentru studiul organitelor citoplasmatice (Altman, Regard, etc.).

De remarcat că marea majoritate a amestecurilor fixatoare conțin substanțe coagulante (grupele I, II și III), țesuturile putînd fi astfel incluzionate în parafină.

1. *Acidul picric*

Se folosește ca fixator mai ales în amestec cu acid acetic, acid azotic, formol sublimat.

De obicei se utilizează sub forma unei soluții apoase saturate, care se prepară prin dizolvarea a cca 1,2 g acid picric în 100 ml apă la 100°C. În alcool, acetonă, cloroform, acidul picric se dizolvă mult mai bine. Din acest motiv se recomandă ca după fixare, materialul să fie spălat în alcool 70—80%.

2. *Alcoolul formolat* (Schaffer)

Alcool etilic 80—100% . . . . . 2 părți
Formol . . . . . 1 parte

3. *Fixatorul Allen*

Acid cromic	1 g
Acid acetic glacial	1 ml
Uree	0,5 g
Apă distilată	100 ml

Se utilizează pentru fixarea țesuturilor vegetale. Timpul de fixare este de 24 ore, după care se face o spălare, timp de 6—24 ore.

4. *Fixatorul Altmann* (1894)

Se cunosc trei variante ale acestui fixator:

I. Tetraoxid de osmiu 2% (soluție apoasă)	1 volum
Bicromat de potasiu 5% (soluție apoasă)	1 volum
II. Tetraoxid de osmiu 2% (soluție apoasă)	1 volum
Bicromat de potasiu 3% (soluție apoasă)	4 volume
III. Tetraoxid de osmiu	2 g
Bicromat de potasiu	5 g
Apă distilată	100 ml

Bicromatul de potasiu și tetraoxidul de osmiu se dizolvă în apă distilată. Altmann a folosit acest amestec pentru evidențierea mitocondriei. Se apreciază că fixatorul Altmann se folosește cu cele mai bune rezultate atît în microscopia optică cît și în microscopia electronică. Se recomandă ca piesele care urmează să fie fixate să nu depășească 2 mm grosime.

Citoplasma celulelor fixate cu reactivul Altmann are un aspect omogen, organitele celulare își mențin forma — parțial datorită faptului că citoplasma înconjurătoare nu este distorsionată prin coagulare — ambii constituienți ai fixatorului fiind fixatori lipidici.

Se obțin rezultate bune după o fixare de 4 zile, efectuată la întuneric, la o temperatură scăzută.

Bicromatul de potasiu are capacitatea de oxidare mai mare decît teraoxidul de osmiu, previne înogrirea excesivă a țesuturilor și ușurează colorarea cu coloranți acizi. Reactivul Altmann nu poate fi folosit pentru studiul nucleului și cromozomilor, deoarece determină dizolvarea nucleoproteinelor. De asemenea materialul astfel fixat nu poate fi incluzionat în parafină, deoarece țesuturile suferă distorsiuni sau fragmentări, iar secțiunile executate la microtom nu pot fi etalate pe lamă.

Bicromatul de potasiu poate fi înlocuit cu bicromatul de amoniu, pH reactivului ce conține bicromat de potasiu este de 4,0, iar cu bicromat de amoniu aproximativ același.

Se recomandă folosirea reactivului Altmann cu bicromat de amoniu pentru evidențierea mitocondriilor. Mitocondriile din celulele de la suprafața țesutului incluzionat nu sînt bine fixate, în schimb cele din celulele plasate în interiorul țesutului sînt mult mai bine fixate de bicromatul de amoniu.

După fixare, materialul se păstrează 8 zile în bicromat de potasiu 3% și se spală cu apă de robinet 24 ore.

5. *Fixatorul Battaglia*

Alcool etilic 95%	5 părți
Cloroform	1 parte
Acid acetic glacial	1 parte
Formol	1 parte

Materialul este bine fixat după 5 minute. Se recomandă pentru studii de citologie.

6. *Fixatorul Benda*

Acid osmic 2%	12 ml
Acid cromic 1%	25 ml
Acid acetic glacial	5—6 picături

Se prepară în momentul utilizării și se păstrează în sticle colorate la rece. Materialul se fixează 24 ore după care se spală în apă 5—6 ore.

7. *Picroformolul Bouin*

Acid picric (soluție saturată)	3 părți
Formol 40%	1 parte
Acid acetic glacial	5%

Acidul acetic glacial poate fi înlocuit cu acidul triclor acetic 2%. Se prepară în momentul utilizării. Se folosește ca fixator în studiile

de histologie și citologie. Fiind un fixator cu o rată de penetrație foarte mare se pot fixa piese destul de mari, iar timpul de fixare poate fi prelungit pînă la 3 zile, fără riscul de a deteriora materialul. Pentru îndepărtarea fixatorului materialul se introduce în 2—3 băi de alcool 90%.

8. *Fixatorul Bouin-Hollande*

Acetat neutru de cupru	2,5 g
Acid picric	4,0 g
Formol 40%	10,0 ml
Acid acetic glacial	1,5 ml
Apă distilată	100 ml

Modul de preparare — într-un mojar cu apă distilată se dizolvă acetatul neutru de cupru, în care se adaugă treptat acidul picric. După dizolvarea completă se filtrează. Se adaugă formolul și acidul acetic glacial. Fixarea se realizează în 72 ore, după care materialul se spală cu apă distilată rece. Este un fixator cu o rată de penetrație mare, recomandat pentru fixarea proteinelor și lipidelor, din țesuturile vegetale.

9. *Fixatorul Bouin-Maire* (picroformolul Duboscq-Brasil sau picroformolul Duboscq)

Soluția A

acid picric	1 g
acid acetic glacial	1 ml
formol 40%	20 ml
alcool etilic 70%	70 ml

Soluția B

acid picric	1 g
acid acetic glacial	15 ml
formol 40%	150 ml
alcool etilic 70%	150 ml

Modul de preparare: se dizolvă acidul picric în alcool, iar în momentul folosirii se adaugă celelalte substanțe. Materialul se fixează timp de 24—48 ore, după care se spală în alcool etilic 70% (care se schimbă de 3—4 ori) și apoi în alcool etilic absolut sau alcool etilic 96%, pînă dispare culoarea galbenă. Materialul fixat se spală în apă de robinet, 30 minute. Este recomandat pentru studiul nucleului și cromozomîlor.

10. *Fixatorul Brodski*

Alcool etilic	1 parte
Formol	3 părți
Acid acetic glacial	0,3 părți

Fixatorul Brodski se folosește pentru studii de arhitectură celulară, și citochimie (în mod deosebit fixează ARN). Durata de fixare este de 1—1,5 ore, maximum 6 ore. După fixare materialul trebuie spălat cu apă de robinet în jet continuu, sau cu alcool etilic 70% schimbat de 3—4 ori.

11. *Fixatorul Buller*

Formol 40%	5 ml
Acid acetic glacial	5 ml
Alcool etilic 50%	91 ml

Se recomandă pentru fixarea ciupercilor, în vederea evidențierii nucleului. Fixarea durează 8 ore, după care materialul se spală în alcool (diferite concentrații) și apă.

12. *Fixatorul Carnoy*

Se folosește cu rezultate similare în mai multe variante

I. Alcool etilic absolut	6 părți
Acid acetic glacial	1 parte
Cloroform	3 părți
II. Alcool etilic absolut	3 părți
Acid acetic glacial	1 parte

Se folosește frecvent pentru fixarea materialului necesar studiilor de citologie, în special pentru evidențierea nucleului și cromozomilor. Are o putere de penetrație mare și rapidă. Fixarea se relizează în 1—12 ore. Se pregătește în momentul folosirii numai în cantitatea necesară. Uneori acidul acetic este înlocuit cu acidul propionic.

I. Alcool etilic 95%	3 părți
Acid propionic	1 parte
II. Alcool etilic 95%	100 ml
Acid propionic	100 ml
Hidroxid de fier	0,4 g

La 10 ml amestec fixator, se adaugă cîteva picături de carmin înainte de întrebuințare.

III. Alcool etilic absolut	3 părți
Acid propionic	1 parte
Cloroform	4 părți
IV. Alcool etilic 95%	15 părți
Formol	1 parte
Acid propionic	2 părți

13. *Fixatorul Champy*

Bicromat de potasiu 3%	7 ml
Acid osmic 2%	4 ml
Acid cromic 1%	7 ml

Soluțiile se prepară separat și se amestecă în momentul utilizării, iar proporțiile indicate se folosesc pentru fixarea mitocondriilor.

14. *Reactivul Clarke (1851)*

Alcool etilic absolut	3 volume
Acid acetic glacial	1 volum

Reactivul Clarke este primul fixator folosit în studiile de citologie și histologie. Deși componenții reactivului Clarke nu sînt fixatori de calitatea superioară, sînt preferați altora, în numeroase studii de citologie. Contractarea țesutului determinată de alcoolul etilic este compensată de acțiunea acidului acetic. Acidul acetic solubilizează nucleoproteinele care sînt eliberate din sucul nuclear și ambii constituenți, nucleoproteinele și sucul nuclear, sînt fixați de alcoolul etilic.

Reactivul Clarke este frecvent folosit în studiile de citologie, histologie, histochimie și anatomie fiind recomandat pentru studiul morfologiei și numărul cromozomilor. Anulează fixarea aditivă avînd drept urmare modificarea punctului izoelectric al proteinelor. Nu se recomandă pentru studiul incluziunilor citoplasmatice.

15. Cloroformul ($CHCl_3$) — este un lichid incolor, cu un miros dulceag caracteristic, cu punctul de fierbere la 61,5°C și densitatea de 1,498. Este puțin solubil în apă și se dizolvă ușor în alcool, eter și tetraclorură de carbon. Se utilizează numai în amestecuri fixatoare. Difuzează în complexele lipidice ale citoplasmei.

16. *Soluție cromo-acetică*

Acid cromic 1%	70 ml
Acid acetic 1%	30 ml

Materialul se fixează 24 ore, după care se poate deshidrata în vederea includerii în parafină.

17. *Reactivul Flemming (1884)*

Reactivul Flemming se folosește în mai multe variante :

I. Trioxidul de crom 5%	0,3 ml
Tetraoxidul de osmiu 2%	4,0 ml
Acid acetic 20%	0,5 ml
Apă distilată	0,8 ml

pH = 1,4. Acidul acetic nu modifică valoarea pH. Trioxidul de crom, tetraoxidul de osmiu și acidul acetic, sînt dizolvați în apă distilată Trioxidul de crom coagulează proteinele iar tetraoxidul de osmiu este un agent necoagulant al proteinelor.

II *Soluția A*

Acid cromic 1%	11 ml
Acid acetic glacial	1 ml
Apă distilată	4 ml

Soluția B

Acid osmic	2 g
Acid cromic 1%	100 ml

Soluțiile se prepară separat și se amestecă în momentul folosirii în raport de 1 : 1.

III. Acid cromic 1%	15 ml
Acid osmic 2%	4 ml
Acid acetic glacial	1 ml

Se recomandă păstrarea în sticle colorate și la întuneric. Pentru a evita alterarea acidului osmic se procedează astfel : se dizolvă 0,5 g tetraoxid de osmiu în 118,7 ml acid cromic 1%. În momentul folosirii se adaugă 1 ml acid acetic, la 19 ml amestec de tetraoxid de osmiu și acid cromic 1%. Se recomandă folosirea acestui reactiv în cazul colorării cu anilină sau safraninâ. După fixare se spală 12 ore la un jet de apă de robinet.

IV. *Flemming diluat*

Acid osmic 2%	2,5 ml
Acid cromic 1%	12,5 ml

Acid acetic 1% . . . . . 5,0 ml
Apă distilată . . . . . 30,0 ml

Se recomandă fixarea unor piese anatomice a căror grosime nu trebuie să depășească 2 mm. Reactivul poate fi îndepărtat din piesele fixate prin spălarea în apă de robinet. Se apreciază că un rol important în obținerea unor rezultate de calitate superioară îl are constituentul necoagulant, deși după includerea în parafină nu asigură obținerea unor secțiuni **de bună calitate. În schimb** constituienții coagulanți, acidul cromic sau trioxidul de crom, determină spații în care pătrunde parafina. Trioxidul de crom se folosește pentru fixarea celulelor la care se studiază cromozomii. În absența substanțelor necoagulante, incluziunile citoplasmatice sînt deformate mecanic sau uneori chiar distruse. Rezultă că trioxidul de crom (componenta coagulantă) și tetraoxidul de osmiu (componenta necoagulantă) au o acțiune complementară, fiind astfel **eliminate deficiențele pe** care le-ar produce în materialul fixat, dacă **ar acționa separat. Acidul acetic** are o acțiune de prevenire a micșorării excesive. Țesuturile fixate exclusiv în acid acetic își măresc volumul, dar se contractă intens printr-o deshidratare ulterioară. Dacă țesuturile sînt stabilizate printr-o acțiune simultană a unui fixator proteic, starea de contracție este mult mai puțin pronunțată.

Unul din neajunsurile reactivului Flemming constă în aceea că, substanțele chimice componente pătrund în țesut cu viteze diferite.

Tetraoxidul de osmiu acționează intens asupra zonei externe a țesutului, iar trioxidul de crom și acidul acetic asupra celei interne. Din această cauză coloranții nu sînt eficienți. Citoplasma celulelor fixate cu reactivul Flemming **este omogenă, putînd fi bine** evidențiate diferite incluziuni citoplasmatice. De asemenea nucleul și cromozomii sînt bine fixați.

18. *Formaldehida* (HCHC)

Formaldehida 40% W/v . . . . . 10 ml
Clorură de sodiu 10% . . . . . 7 ml
Apă distilată . . . . . 83 ml

Formaldehida este frecvent folosită ca fixator simplu în studii de microscopie fotonică. Pentru aceasta, formaldehida se dizolvă într-o soluție apoasă de 10% de sare de bucătărie în concentrația care determină aceeași presiune osmotică sau mai scăzută ca a organismului în stare vie. Soluția de formaldehidă se păstrează un timp mai îndelungat prin adăugarea de carbonat de calciu. pH soluției este 7,6. Din țesutul fixat, formaldehida se îndepărtează prin spălare cu alcool etilic 50%. Se apreciază că sărurile care se adaugă formaldehidei contribuie la obținerea unei fixări de calitate superioară, evitînd sau reducînd contractarea țesutului, sau apariția unor fisuri cauzate de formaldehidă.

Este un fixator des întrebuințat în special pentru păstrarea materialului biologic.

Ca fixator simplu, formaldehida este folosită în special pentru fixarea lipidelor în vederea efectuării unor studii de histochimie. Difuzează ușor, nu formează precipitate și păstrează structura și culoarea țesutului.

După o fixare în formaldehidă, timp de 6 ore, se recomandă ca țesutul să fie transferat în soluție saturată de bicromat de potasiu, păstrată în termostat la 37°C, pentru una sau două zile. Țesutul fixat se spală în apă de robinet timp de 10—12 ore. Păstrarea timp îndelungat determină alterarea structurilor fine. Este mai puțin indicat pentru citologie. Se recomandă păstrarea în sticle colorate, la temperaturi mai mari de 9°C.

19. *Fixatorul Gammalund*

Sulfat de cupru (soluție concentrată) . . .	15 părți
Formol	1 parte
Apă distilată	5 părți

După păstrarea în fixator Gammalund, materialul se transferă în soluție de formol (50 ml formol în 1000 ml apă distilată). Se folosește pentru fixarea cloroplastelor.

20. *Reactivul Helly* (1903)

Clorură mercurică	5 g
Bicromat de potasiu	2,5 g
Sulfat de sodiu	1 g
Apă distilată	100 ml

Înainte de folosire, la 10 ml reactiv Helly se adaugă 0,5 formalină, neutralizată cu carbonat de calciu, pH reactivului Hellly este de 3,7.

Țesuturile se fixează în circa 12 ore la întuneric. Reactivul Helly se îndepărtează din țesut prin spălarea la un curent continuu de apă de robinet sau prin introducerea și menținerea materialului timp de 24 ore într-o soluție apoasă saturată de bicarbonat de potasiu, la 37°C. Țesutul fixat se deshidratează în seria de alcooli și se tratează cu iod. Reactivul Helly este unul dintre cei mai buni fixatori pentru evidențierea incluziunilor citoplasmatice din celulele țesuturilor incluzionate în parafină.

Reactivul Helly conține o substanță care coagulează proteinele (clorura mercurică), **alta necoagulantă (formaldehida)** și un fixator al multor lipide (bicromatul de potasiu).

Deși are o compoziție asemănătoare cu reactivul Zenker, formaldehida și bicromatul de potasiu au o acțiune complet diferită asupra țesutului în comparație cu acidul acetic și bicromatul de potasiu.

Clorura mercurică și formaldehida nu au acțiune conjugată asupra citoplasmei, care devine spongioasă, favorizînd pătrunderea parafinei cu ușurință.

Postcromatizarea se recomandă pentru studiul mitocondriilor. În general mitocondriile sînt bine fixate cu excepția celor din ficatul mamiferelor care au tendința de scurtare și rotunjire.

21. *Fixatorul Karpecenco* (1927)

Soluția A

Acid cromic	1 g
Acid acetic glacial	10 ml
Apă distilată	90 ml

Soluția B

Formol 40%	**10 ml**
Apă distilată	40 ml

Soluția A și B se prepară separat și se amestecă în momentul utilizării. După fixare materialul se spală în apă rece. Pentru realizarea unei mai bune colorări, secțiunile se vor spăla într-o soluție de acid cromic 3% și acid acetic 1,5% timp de 30—80 minute urmată de o spălare în apă 30 minute.

22. *Fixatorul Levitski*

I. Acid cromic 1%	3 ml
Formol 4% (10% industrial)	17 ml

Durata de fixare este de 2 zile

II. Acid cromic 1%	15 ml
Acid osmic 2%	2 ml
Apă distilată	18 ml

Durata de fixare este de 6 zile

III. Acid cromic 1%	15 ml
Acid osmic 2%	4 ml

Fixarea se face în 9 zile

Materialul fixat în soluția I este trecut în soluția II sau III. După fixare, materialul se spală cu apă de robinet în jet continuu, timp de 24 ore. Se folosește pentru fixarea mitocondriilor.

23. *Fixatorul Mann*

Biclorură de mercur	2,5 g
Acid picric	1 g
Formol 40%	20 ml
Apă distilată	100 ml

Se dizolvă biclorura de mercur în apă fiartă după care se adaugă acid picric. În momentul utilizării se adaugă formolul în ambele soluții.

O altă variantă a fixatorului Mann are următoarea compoziție :

Acid osmic 1%	1 parte
Sublimat de NaCl 75%	1 parte

Fixarea se realizează în 24—72 ore, la întuneric.

Se utilizează în studii citologice.

24. *Fixatorul Maximov*

Soluție Müller	100 ml
Biclorură de mercur	5 g
Acid acetic glacial	5 ml
Formol 40%	10 ml
Acid osmic 1%	10 ml

Soluția *Müller* are următoarea compoziție :

Sulfit de sodiu	1 g
Bicromat de potasiu	2,5 g
Apă distilată	100 ml

Se separă în momentul utilizării. Fixarea se realizează în timp de 24 ore.

25. *Fixatorul Meves*

Acid osmic 2%	10 ml
Acid cromic 1%	50 ml

Materialul se fixează 24 ore, după care se spală în apă de robinet 6—12 ore.

26. *Fixatorul Modilevski*

Acid cromic, soluție apoasă 1%	10 ml
Acid acetic glacial	1 ml
Aldehidă formică (formol) 40%	4 ml

Se recomandă să fie preparat în momentul utilizării și se păstrează în sticle colorate la întuneric. După fixare care se realizează în 6—24 ore materialul se spală în apă timp de 6—12 ore. Se folosește pentru studiul cromozomilor.

Pentru studiul sacului embrionar se recomandă o variantă a fixatorului Navașin cu următoarea compoziție :

Soluția A

Acid cromic	2 g
Acid acetic glacial	20 ml
Apă distilată	120 ml

Soluția B

Aldehidă formică	37 ml
Apă distilată	113 ml

Se prepară și se păstrează separat fiecare soluție. În momentul utilizării se amestecă în raport de 1 : 1. Materialul este ținut în fixator 24—28 ore după care este spălat, la jet mic 24 ore. După spălare se trece prin alcool etilic de diferite concentrații 15, 35, 55, 70, 80, 90, 95% timp de 2 ore, în fiecare concentrație. Se păstrează în alcool 70° în sticle colorate ermetic închise și la frigider. Dacă secțiunile fixate cu reactivul Navașin nu se colorează satisfăcător se vor spăla într-o soluție de acid cromatic 3% și acid acetic 1,5% timp de 15—60 minute, după care se spală din nou în apă de robinet 30 minute.

Fixatorul Navașin, are o rată de penetrație foarte mare și produce o fixare excelentă. Este unul din cei mai buni fixatori care se folosesc în studiile de citologie și embriologie avînd avantajul că nu determină deformarea țesuturilor și celulelor.

28. *Fixatorul Nemet*

II. Acid picric (soluție saturată)	100 ml
Acid sulfuric concentrat	0,5 ml
Acid acetic glacial	70,5 ml

Materialul se fixează 24 ore după care se spală cu alcool etilic 60%. Se folosește pentru evidențierea plasmodesmelor. În același scop se folosește, de asemenea, un amestec format din alcool etilic 70% — 50 părți și formol — 10 părți. Fixarea se face timp de 24 ore, după care materialul se spală în alcool etilic 70% și se păstrează în alcool etilic 96%.

29. *Fixatorul Newcamer*

Alcool izopropilic	6 părți
Acid propionic	3 părți
Dioxan	1 parte
Acetonă	1 parte
Eter de petrol	1 parte

Se folosește pentru fixarea spicelor de graminee în vederea studiului diviziunii reducționale (meiozei). Spicele tinere se fixează timp de 24 ore la temperatura camerei. După fixare, spicele se păstrează în fixator Newcamer, în eprubete închise ermetic sau în sticle cu dop rodat, în frigider. În ultimul timp se folosește și pentru fixarea rădăcinilor adventive la care se studiază mitoza.

30. *Fixatorul Regaud*

I. Bicromat de potasiu 3%	40 ml
Formol 4%	10 ml

Are un efect similar fixatorului Altmann. Se prepară în momentul folosirii. Se obțin rezultate după o fixare de 4 zile, la întuneric urmată de un tratament cu o soluție de bicromat de potasiu 3%, timp de 8 zile. Materialul astfel fixat se spală în apă de robinet 24 ore.

II. Bicromat de potasiu 3%	80 ml
Formol	20 ml

Materialul se fixează timp de 4 zile la întuneric, zilnic fiind înlocuit fixatorul. După fixare, materialul se trece în soluție de bicromat de potasiu 3%, timp de 8—13 zile, după care se spală în apă distilată, 24 ore.

31. *Tetraoxidul de osmiu* (OsO_4)

Tetraoxidul de osmiu dă rezultate excelente dacă nu se folosește în amestec cu alți fixatori primari și dacă țesutul fixat este incluzionat într-o substanță potrivită cum este metacrilatul. În situația în care incluzionarea se face în parafină țesutul se contractă și suferă distorsiuni. Tetraoxidul de osmiu se folosește ca fixator în special în microscopia electronică în concentrație de 1% w/w/ în apă distilată. Rezultate, de asemenea excelente, se obțin dacă tetraoxidul de osmiu este dizolvat în soluție tampon Michaelis — pH = 7,4 (Claude, 1962; Malhotra, 1962). OsO_4 pătrunde în țesut lent și produce cele mai mici modificări în structura citoplasmei și nucleului. Se folosește pentru fixarea mitocondriei, grăsimilor, lipoizilor etc.

32. *Sublimatul acetic*

Biclorură de mercur	2 g
Acid acetic glacial	2 ml
Apă distilată	100 ml

Se utilizează în studii de citologie la ciuperci. Fixarea se realizează în 12—24 ore. Colorantul adecvat pentru o asemenea fixare este hematoxilina ferică și eosina.

33. *Fixatorul Zenker* (1894)

Clorura de mercur	5 g
Bicromat de potasiu	2,5 g
Sulfat de sodiu	1 g
Apă distilată	100 ml

La 20 ml soluție Zenker se adaugă 1 ml acid acetic glacial înainte de folosire pH = 2,5 (Casselman, 1959). Piesele trebuie să fie de dimensiuni foarte mici, iar fixarea se realizează în 3—6 ore. Prelungirea timpului de fixare duce la o colorare de calitate inferioară. Spălarea reactivului se realizează cu apă de robinet, timp de 10—12 ore, eventual

în timpul nopții. Țesutul se deshidratează prin introducerea în soluție de celosolv 50%, apoi în soluție de celosolv 0,5 w/v și din nou în iodină nediluată.

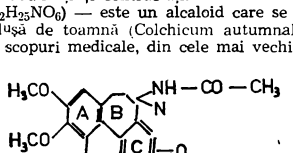
Reactivul Zenker conține două substanțe coagulante a proteinelor (clorura de mercur și bicromatul de potasiu). Acidul acetic determină întărirea țesutului. Clorura de mercur asigură o bună colorare iar bicromatul de potasiu, datorită acidității sale, favorizează acțiunea coloranților acizi. Se recomandă pentru studiul incluziunilor citoplasmatice. O deficiență a reactivului Zenker, constă în tendința de a încreți fibrele de colagen.

Soluții prefixatoare

Pentru studiul morfologiei cromozomilor și alcătuirea cariotipului se recomandă ca materialul biologic, în special țesutul meristematic sau sporogen să fie prefixat cu una din soluțiile : colchicină 0,01%, emulsie de α-bromonaftalena, α-iodonaftalena, α-cloronaftalena, 3-hidroxichinoleină orto 0,03%, iar în lipsa acestora cu apă rece 1—2 C).

Prefixarea se face cu scopul de a inhiba formarea fusului nuclear și de a determina acumularea unui număr mai mare de metafaze cu cromozomi bine individualizați și contractați.

Colchicina ($C_{22}H_{25}NO_6$) — este un alcaloid care se găsește în natura în bulbii de brîndușă de toamnă (Colchicum autumnale) 2n = 38, din care s-a extras, în scopuri medicale, din cele mai vechi timpuri (fig. 57).



Colchicina ($C_{22}H_{25}NO_6$) — fiind o substanță toxică, din punct de vedere chimic, este derivat aminat și metaxilat al fenantrenului, provoacă o hipertrofie a țesutului tratat și care este cu atît mai puternică cu cît în țesutul respectiv se găsesc mai multe celule în diviziune. Aceasta se datorește faptului că acțiunea toxică a colchicinei se exercită în special asupra fusului nuclear. La nivel molecular, colchicina acționează asupra legăturilor sulfhidrice din molecula proteinelor, a moleculelor de riboză și a acidului ribonucleic. Datorită acestor modificări, diviziunea celulară capătă un aspect caracteristic denumit C mitoză și respectiv C meioză.

Acțiunea nocivă a colchicinei se exercită asupra structurii microscopice și submicroscopice a fibrelor fusului nuclear, provocînd o dezorganizare a acestora și inhibă formarea fusului de diviziune celulară (statmocineza). Colchicina poate de asemenea să determine blocarea parțială a formării fusului de diviziune (merostatmocineza) sau orientarea neregulată a fusului de diviziune (tropocineza).

Citoplasma devine mai fluidă, iar cromozomii se contractă și se împrăștie în întreaga celulă, fără a mai forma placa ecuatorială, avînd de afface cu pseudometafaza. Cromozomii dispersați în celulă sînt mai scurți

și mai groși — avînd dimensiunile caracteristice speciei, iar cromatidele omoloage rămîn unite numai prin centromer, luînd forma literei X.

Pentru prefixare se folosește o soluție apoasă de 0,01% în care materialul biologic rămîne imersionat 3—3,5 ore după care este trecut în soluție fixatoare. Prefixarea se face în frigider la +1 — +4°C.

α-*Bromonaftalena* ($C_{10}H_7Br$). Naftalina este o substanță solidă cu miros caracteristic, avînd punctul de topire la 80°C. Se prepară prin picurarea de brom în amestecul naftalen și CCl_4. Prin distilare se elimină CCl_4 și rezidul se reia cu NaOH și se distilează la presiune redusă. Se obțin două forme cu punctul de topire de 0,2—0,7°C și respectiv 6,2°C. Punctul de fierbere este de 281,1°C la presiunea de o atmosferă. Indicele de refracție n 16,5 = 1,66011. Prezintă slabă solubilitate în apă. Este miscibilă cu alcool, eter, benzen, cloroform. Se dizolvă 25 grame α-bromonaftalenă în 75 ml apă distilată. Se păstrează în sticle colorate și închise ermetic. Înainte de folosire, sticla se agită puternic, după care se lasă cîteva minute pentru ca excesul de bromonaftalenă să se depună la fundul vasului. Pentru fixare se folosește emulsia rezultată.

În lipsa α-bromonaftalenei, care dă cele mai bune rezultate, se poate folosi α-cloronaftalena ($C_{10}H_7Cl$) sau α-iodonaftalena ($C_{10}H_7I$) care se prepară în mod asemănător.

8. *Hidroxichinoleina- orto* (C_6H_9NOH)

8-hidroxichinoleina -orto	0,03 g
Apă distilată	100 ml

8-hidroxichinoleina (oxina) se prezintă sub forma unor cristale albe cu greutatea moleculară de 145,15. Se obține prin încălzirea orto-aminofenolului cu orto-nitrofenol, glicerină și acid sulfuric după reacția Skraup.

Se topește la 76°C și fierbe la aproximativ 267°C.

8-hidroxichinoleina-orto se dizolvă greu în apă și se recomandă ca soluția să se pregătească la temperatura de 50—60°C.

Se dizolvă bine în alcool, acetonă, cloroform, benzen și ape acide cu acizi minerali.

Prefixarea optimă se realizează la temperatura scăzută timp de 3 ore.

7. COLORANȚI ȘI METODE DE COLORARE

7.1. INTRODUCERE ÎN TEHNICA COLORĂRII

Pentru a scoate cît mai bine în evidență unele detalii structurale, în vederea efectuării unor studii de citologie, histologie și embriologie, este indispensabilă colorarea diferențiată a materialului, viu sau fixat. Colorarea diferențiată este posibilă datorită afinității deosebite pe care o au unii coloranți față de diferite elemente celulare (membrană, citoplasmă, nucleu, condriom, vacuom etc.). Constituienții celulari se combină cu ionii colorantului și astfel va rezulta o culoare specifică. Colorantul adecvat se fixează pe elementul față de care are afinilitate cu atîta intensitate, încît nu mai poate fi îndepărtat prin o spălare obișnuită. Distribuția finală a colorantului depinde de rata de penetrație a colorantului în țesut și afinitatea constituienților celulari pentru ioni coloranți. Constituienții celulari se combină cu ionii colorantului și astfel va rezulta o culoare specifică. De obicei coloranții nu-și schimbă culoarea prin combinarea ionilor cu constituienții celulari.

Coloranții au fost clasificați după diferite criterii. Astfel după structura lor chimică, coloranții au fost împărțiți în mai multe grupe :

— coloranți nitrici și nitrozofenolici ;
— coloranți azoici ;
— coloranți hidroxi- și aminochinonici ;
— indofenoli și indamine ;
— coloranți oxazinici, tiazinici și fenazinici ;
— coloranți di- și trifenilmetanici ;
— coloranți xantenici și acridinici ;
— ftalocianine ;
— indigiode ;
— coloranți cianinici ;
— coloranți porfinici (hemoglobine și clorofile) ;
— coloranți antocianici ;
— coloranți flavonici.

După natura lor coloranții se împart în coloranți naturali (extrași din produse animale și vegetale) și coloranți artificiali (sintetici) — obținuți pe cale sintetică din substanțe chimice (minerale și organice). Coloranții sintetici, după reacția pe care o au, se împart în : coloranți bazici (nucleici deoarece colorează în special nucleul) : conțin un cation

colorant : albastru de metilen, albastru de anilină, safranină, verde de lumină, violet de gentiana, fuxină etc.) și coloranți acizi (citoplasmatici) — conțin un anion colorat : eosina, orange G, fuxina acidă, roșu de Congo, eritrosina etc.).

Erlich consideră că există și coloranți neutri ce au proprietatea de o colora toate elementele dintr-un țesut, iar Michaelis a creat o nouă grupă de coloranți numiți indiferenți — care nu sînt nici baze, nici acizi, nici săruri și nu au capacitatea de a forma săruri. *Coloranții compuși* (Giemsa) sînt constituiți din baze colorate poliacide, care pot combina în mod variat și dau săruri acide, bazice și neutre.

Coloranții folosiți în tehnicile de laborator sînt substanțe organice aromatice, solide, cristalizate, care se dizolvă în apă sau soluții apoase, sub formă de ioni, anioni și cationi fiind colorați. Ionii colorantului se leagă chimic de proteine sau alți constituienți tisulari fără a se modifica sau pierde culoarea.

Numeroase culori întîlnite în natură, în lumea plantelor și animalelor, dispar în momentul în care substanțele chimice respective sînt dizolvate, deoarece nu sînt parte a unui colorant întrinsec al moleculei sau particulei mai mici ale substanței colorate. Prin examinarea substanțelor care rămîn colorate în soluție s-a constatat că acestea sînt formate din cîteva grupe principale. De exemplu, este cunoscut faptul că sărurile de crom, fier și cobalt sînt colorate și culorile se păstrează prin dizolvare.

Colorarea se bazează pe următoarele principii (C. Rabega, Rabega M., 1975) :

— un corp transparent devine colorat în culoarea complementară celei pe care o absoarbe ;

— un corp devine colorat în culoarea pe care o reflectă, complementară cu cea absorbită ;

— corpul opac este alb dacă reflectă toate radiațiile și negru dacă le absoarbe pe toate.

Corpurile se caracterizează prin absorbția lor selectivă, absorbind radiațiile de o anumită lungime de undă.

$I = Io^{\alpha d}$

Io — intensitatea radiației incidente

I — intensitatea radiației emergente

l — baza logaritmilor neperiene

α — coeficientul de absorbție

d — grăsimea substanței pe care o străbate.

În logaritmi zecimali relația $I = Io^{-d}$ devine $I = Io^{-kd}$.

k — coeficientul de extincție.

Pentru o soluție oarecare relația $I = Io^{-kd}$, devine $I = Io^{\varepsilon kd}$

k — coeficientul de extincție moleculară

ε — depinde de lungimea de undă a radiației incidente ($\varepsilon = f(\lambda)$

c — concentrației soluției, în moli/litru.

Absorbția selectivă a luminii de către o substanță depinde de existența în moleculă a unui sistem de electroni. Prin absorbția radiației luminoase, moleculele substanței trec de la un nivel de energie inițial (stare fundamentală) la un nivel mai ridicat (stare excitată). Trecerea de

la o stare fundamentală la starea excitată este numită tranziție, iar energia corespunzătoare energiei de tranziție, care se poate calcula cu ajutorul formulei :

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

h = constanta lui Planck
c = viteza luminii
λ = lungimea de undă a radiației absorbite.

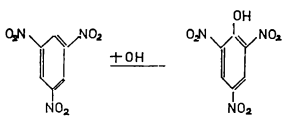
O substanță este cu atît mai excitabilă din punct de vedere al absorbției luminoase, cu cît numărul de electroni II, existenți în moleculă este mai mare (C. Rabega, M. Rabega, 1975).

Pentru ca o substanță să fie colorată trebuie să conțină o anumită nesaturare determinată de una sau mai multe duble legături, răspunzătoare de existența culorii. Principalele grupări duble (cromofore) sînt următoarele : —N=N— (azo) ; >C=N —(azometrică) ; >C=O (carbonilică) ; >C=C< (etilenică) ; —N=O (nitrozo) ; —N<O/O (nitro) ; >S<O/O (sulfonil) ; >C=S (tiocarbonilică).

Ionii și complexele ionice formate din elemente de tranziție sînt colorați. Se consideră că elementele care dau ioni colorați sînt metale și posedă un înveliș exterior de electroni incomplet. Alți cercetători apreciază că nici un colorant nu posedă un element de tranziție sau vreun atom particular și culoarea se datorește structurii interatomice și nu celei intraatomice. Intesitatea colorării este determinată de reacțiile de oxidare și reducere ce au loc.

Deoarece cei mai mulți compuși aromatici și un număr mic de compuși alifatici sînt colorați se consideră că substanțele colorate au o structură inelară, care favorizează absorbția luminii cu o lungime de undă particulară și determină culoarea. De altfel toți coloranții sînt compuși aromatici. De exemplu benzenul, cel mai simplu compus aromatic apare colorat dacă va fi observat în lumină ultravioletă cu lungimea de undă de 256 mμ. Alternarea legăturilor simple și duble între atomii de carbon, excită molecula de o lungime de undă particulară, fiind astfel absorbită lumina la o lungime de undă mai mare, rezultînd culoarea. În mod practic prin introducerea unui cromofor — o substanță inelară, devine colorată. De exemplu, benzenul care este incolor, se transformă prin nitrare în nitrobenzen, care este gălbui-pal.

Prin introducerea unui număr mai mare de cromofori, maximum de absorbție se deplasează spre lungimi de undă mai mari astfel că efectul baterom se mărește și se manifestă prin intensificarea culorii. De pildă, dinitrobenzenul este mai gălbui decît nitrobenzenul iar trinitrobenzenul are o culoare mai intensă decît dinitrobenzenul. Pentru ca o substanță colorată să fie și colorantă, trebuie să conțină grupări auxocrome, care conferă capacitatea de a se fixa pe suportul pe care se depune. Principalii auxocromi sînt ; —NH_2 ; —NH—CH_3—$N(CH_3)_2$; —NH—C_6H_5—OH ; —O—CH_3 ; —O—C_2H_5. De exemplu dacă în trinitrobenzen introducem un auxocrom (de pildă OH), rezultă acidul picric — unul din cei mai vechi coloranți sintetici (fig. 58).



Trinitrobenzen (galben pal) acid picric (galben intens)

O configurație frecventă a coloranților este de guinonoid și substanțele care posedă un inel paraquinonoid, fiind colorate. Parabenzoquinona este cea mai simplă substanță din acest grup, care se prezintă sub formă solidă, de culoarea galbenă.

Structura coloranților poate fi ilustrată de pararosanilina, substanță solidă, ușor solubilă în apă, care rezultă prin combinarea, în proces tehnologic, a anilinei și paratoluidinei. Anilina în stare pură este un lichid incolor, iar paratoluidina este o substanță solidă, cristalizată și incoloră. Încălzită în prezența unui agent oxidant moderat și a unei surse de ioni, pararosanilina, dezvoltă o culoare. Prin combinarea a două molecule de anilină cu o moleculă de paratoluidină, rezultă o substanță în care unul din cele trei inele este quinonoid.

Pararosanilina posedă un inel quinonoid care conferă culoarea și un grup electric responsabil care îi dă posibilitatea să atace proteinele și alți componenți tisulari. Inelul guinonoid este cromofor sau purtător de culoarea. Gruparea $—NH_2$ se transformă prin conversie în $=^+NH_2$ care asigură protecția culorii, fiind auxocromi și ajută cromoforii să se așeze și să intensifice culoarea.

Auxocromii nu diferă mult între ei. Se cunosc astfel, mulți coloranți care au același auxocrom ca pararosanilina ($=^+NH_2$). Atomul NH_2 este încărcat pozitiv, ionul colorat fiind cationul, colorantul se numește cationic sau bazic. Anionul poate fi clorură, sulfat sau acetat — și în general orice anion anorganic care prezintă suficientă solubilitate. Colorantul poate fi reprezentat prin formula $R^+CR^+Cl^-$ dacă anionul este clorura. Hidrogenul din gruparea $^+NH_2$ este adesea substituit de metil, etil sau aril (arilul este un inel benzenic, cu unu sau mai mulți atomi de hidrogen substituit).

Atomii de hidrogen din auxocromii bazici pot fi de asemenea înlocuiți de grupul metil, etil sau aril, ceea ce determină modificarea culorii. Înlocuirea unui atom de hidrogen din pararosanilina, determină culoarea albastră și cristal violet. Intensitatea culorii depinde de numărul de atomi substituiți din molecula pararosanilinei. Grupul etil și în particular aril influențează în mai mare măsură intensitatea culorii.

Se întîlnesc de asemenea numeroși coloranți al cărui ion negativ este colorat. Coloranții cu atomi coloranți sînt denumiți anionici sau acizi. Cationul acestor coloranți este de obicei sodiu sau potasiu. Dacă cationul este sodiu, formula colorantului poate fi reprezentată Na^+R^-(R^- — anionul colorat). Diferiți auxocromi conferă încărcătura negativă necesară. În mod frecvent sînt prezente grupările sulfonic, hidroxil și carboxil, care prin ionizare dau $—SO^-_3$, $—O^-$ și $—COO^-$.

Menționăm că așa numiții coloranți acizi nu sînt totdeauna acizi și sînt denumiți astfel deoarece posedă grupe potențiale acide (sulfuric, hidroxil, carboxil), denumite radicali acizi. Cea mai simplă formulă pentru acești coloranți este H^+R^-, cationul fiind H.

În afară de auxocromi și cromofori, coloranții posedă deseori atomi sau grupe de atomi denumite modificatori (schimbători).

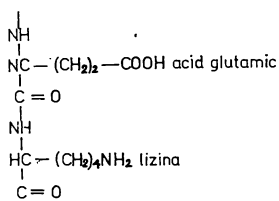
De pildă rosanilina, diferă de pararosanilina numai prin aceea că posedă un grup metil care modifică culoarea devenind albastru strălucitor. Fuxina bazică este un amestec a acestor doi coloranți.

Constituienții tisulari reacționează diferit în contact cu coloranții. Culoarea și intensitatea acesteia se folosesc pentru identificarea constituienților celulari.

Pentru obținerea unei colorări de calitate sînt necesare următoarele condiții; afinitatea chimică între țesut și colorant, densitatea și permeabilitatea țesutului.

7.1.1. AFINITATEA CHIMICĂ

O serie de constituienți tisulari sînt acizi, ca de exemplu ADN, ARN, cromatina, nucleoproteinele, secrețiile unor celule glandulare, unele lipide. Aciditatea ADN, ARN și fosfolipidelor este determinată de grupările fosforice, iar a mucopolizaharidelor se datorește grupărilor sulfurice și carboxil. Citoplasma majorității celulelor nu este nici acidă nici bazică avînd un pronunțat caracter amfoter, sarcina electrică variază ușor cu pH soluției. Caracterul amfoter se datorește unui echilibru între grupările acide și bazice ale aminoacizilor (acidul aspartic, glutamic, hidroxilglutamic și respectiv lizina, arginina, histidina) (fig. 59).



O proteină introdusă într-o soluție cu un pH scăzut punctului său izoelectric, grupările amino ale aminoacizilor bazici au tendința de a se încărca pozitiv, devenind $—^+NH_3$. Dacă pH este superior punctului izoelectric, grupările carboxil acide ale aminoacizilor se ionizează, devenind $—COO^-$.

Dacă aminoacizii bazici și acizi se găsesc în aceeași proporție într-o anumită proteină, sarcina electrică a proteinei suferă o ușoară modificare. Prin schimbarea pH soluțiilor toate proteinele pot avea un caracter amfoter.

Majoritatea coloranților folosiți în laborator sînt acizi (anionici) sau bazici (cationici) și numai un număr foarte mic are un caracter amfoter. Un exemplu de colorant amfoter îl reprezintă haemateina, care este bazică la un pH mai mic de 6,6 (punctul său izoelectric) și anionic (acid) dacă pH este mai mare de 6,6. În general constituienții tisulari încărcați negativ atrag coloranții cationici iar cei încărcați pozitiv fixează coloranți anionici.

Cei mai mulți fixatori determină fixarea coloranților cationici. Fixatorul Zenker este recomandat în cazul folosirii coloranților anionici. În țesuturile colorate cu coloranți cationici se evidențiază în mod deosebit cromatina și în special cromozomii metafazici și anafazici. O culoare intensă prezintă și structurile citoplasmatice care conțin o cantitate mare de ARN. Constituienții tisulari coloranți cu coloranți anionici se colorează diferit. De exemplu cromatina nu prezintă o afinitate specială pentru coloranții anionici, nucleii au aspectul unor cavități în citoplasma colorată. Nu trebuie să se considere că țesuturile bazofile, nu prezintă afinități pentru coloranții anionici iar cele acidofile față de coloranții cationici. Este cunoscut faptul că proteinele acide conțin și cîțiva aminoacizi bazici și invers, astfel toate proteinele dintr-o celulă pot fi colorate în aceeași măsură atît cu coloranții bazici cît și cu cei acizi. Constituienții celulari bazofili vor fi colorați cu ajutorul coloranților bazici, iar cei acidofili cu coloranți anionici (Baker, 1969).

Țesuturile amfotere se colorează atît cu coloranți bazici cît și cu cei acizi, în funcție de pH soluției. În practica de laborator, în special în cercetările de citologie este necesar ca citoplasma să rămînă incoloră. De exemplu, dacă se folosește un colorant cationic în soluție ușor acidă, cum este verdele de metil într-o soluție diluată de acid acetic, cromatina se va colora, în timp ce citoplasma amfoteră rămîne incoloră sau aproape incoloră. Citoplasma amfoteră are o oarecare afinitate pentru coloranții anionici. Deoarece cei mai mulți constituienți celulari au aceeași afinitate pentru diferiți coloranți se recomandă să se întrerupă colorarea în stadiul în care s-a realizat o colorație selectivă. O asemenea colorare este selectivă, deoarece colorarea se realizează progresiv pînă se obține intensitatea dorită. În colorările regresive din contra țesuturile necesită un exces de colorant, intensitatea colorării fiind studiată la microscop și întreruptă în momentul în care se realizează colorarea constituienților celulari. În felul acesta se obține o colorare diferențiată a constituienților tisulari. În colorarea regresivă în mod frecvent se folosesc coloranți acizi. Diferențierea se bazează pe capacitatea acizilor de a se transmite constituienților tisulari amfoteri bazicitatea. Coloranții bazici se folosesc pentru diferențierea în același mod ca și cei acizi.

Țesutul este introdus într-un solvent, cum este alcoolul etilic absolut sau soluție apoasă de alcool etilic în care colorantul este solubil și în care tendința de a rămîne ionizat este redusă sau eliminată. Dacă diferențierea este oprită, constituienții tisulari rămîn necolorați. Țesutul este transferat apoi într-un lichid cum este xilolul, în care colorantul este insolubil.

Sînt autori care susțin că colorantul se leagă de constituienții tisulari printr-o punte de hidrogen și nu prin legături electrostatice. Atomii care pot fi legați prin intermediul hidrogenului sînt puternic electro-

negativi (oxigen, azot, etc.). Grupările hidroxil şi amino de pildă pot fi unite prin intermediul atomilor de hidrogen. Deoarece ambii atomi sînt electronegativi este evident că nu are loc o reacţie între atomii încărcaţi negativ şi pozitiv (B a k e r, 1969). De exemplu, elastina din fibrele elastice este un constituient tisular care se leagă de colorant prin legături de hidrogen. Se consideră că legăturile de hidrogen sînt posibile în următoarele circumstanţe (B a k e r, 1969) :

— dacă acţiunea coloranţilor este insensibilă la pH ;

— dacă acţiunea coloranţilor este insensibilă la un electrovalent, cum este soluţia NaCl 10% (G o l d s t e i n, 1962) ;

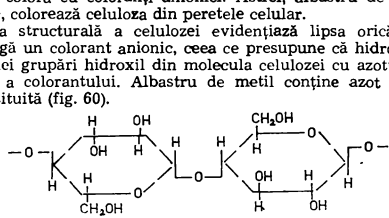
— dacă soluţia colorantului saturată cu uree împiedică colorarea (ureea formează uşor legături de hidrogen şi ocupă locurile libere ale colorantului (G o l d s t e i n, 1962) ;

— dacă acţiunea colorantului cationic este neafectată prin blocarea grupării carboxil a constituienţilor celulari, prin metilare (atomii de hidrogen sînt înlocuiţi cu —CH_3) ;

— dacă acţiunea colorantului anionic nu este afectată prin distrugerea grupării amino din ţesut cu acid azotic.

Constituienţii tisulari acizi lipsiţi de grupări bazice în anumite condiţii se pot colora cu coloranţi anionici. Astfel, albastru de metil, colorant anionic, colorează celuloza din peretele celular.

Formula structurală a celulozei evidenţiază lipsa oricărei grupări care să atragă un colorant anionic, ceea ce presupune că hidrogenul leagă oxigenul unei grupări hidroxil din molecula celulozei cu azotul unei grupări amino a colorantului. Albastru de metil conţine azot în gruparea amino substituită (fig. 60).



Un segment din molecula celuloză.

Grupările peptidice (— C — N —) din molecula proteinelor se leagă
‖ |
O H
prin legături de hidrogen cu grupările amino ale anumitor coloranţi. Se evidenţiază astfel, tendinţa unor coloranţi acizi de a colora constituienţii tisulari şi în felul acesta se pot deosebi coloranţii cu sarcini electrice negative de cei încărcaţi pozitiv. Se cunosc coloranţi acizi care interacţionează cu constituienţi celulari prin sarcinile electrice şi se leagă între ei prin legături covalente sau legături de hidrogen (B a k e r, 1969).

Coloranţii puri au proprietatea de a colora specific constituienţii celulari şi tisulari culoarea fiind diferită de cea a soluţiei. Acest fenomen este numit metacromasie iar coloranţii metacromatici. Constituienţii tisulari care se colorează în nuanţe diferite se numesc cromatropi. Metacromasia se foloseşte frecvent în tehnica citologică ca indicator al compoziţiei chimice.

Coloranţii folosiţi în citologie şi histologie sînt metacromatici şi acţionează asupra aceluiaşi cromatrop. De exemplu, violetul de metil

este un colorant din grupul coloranților triarilmetan, tionina și azur B sînt metacromatici din grupul coloranților tiazinici în care atomii de hidrogen și grupările amino sînt înlocuite prin metil. Nu este pe deplin elucidată cauza metacromasiei. Coloranții metacromatici au tendința de a forma în soluții apoase dimeri și polimeri. Se presupune că cromotropii favorizează formarea dimerilor și polimerilor și menținerea culorii (Michaelis și Granik, 1945; Baker, 1969).

7.1.2. DENSITATEA COLORANȚILOR

Densitatea unui colorant poate fi stabilită astfel: se confecționează două geluri de gelatină 5% și 20% care se fixează cu o soluție de formaldehidă sau un amestec care să conțină formaldehidă. După fixare se efectuează secțiuni fine în grosime de 15 μ, care se introduc în soluție apoasă cu colorant. După spălare cu apă distilată se poate stabili intensitatea culorii care este dependentă de cantitatea de material colorabil care are capacitatea de a reține o anumită cantitate de colorant. Densitatea ambelor secțiuni poate fi aceeași, dar una se poate comporta ca o proteină bazică alta ca una acidă și astfel necesită cantități diferite de colorant.

Celulele în diviziune rețin o cantitate mai mare de colorant bazic (cationic) decît un volum egal de citoplasmă. Acesta se datorește faptului că nucleoproteinele au o activitate mai pronunțată decît citoplasma, iar cromozomii metafazici au o structură mai densă. Densitatea cromozomilor se evidențiază prin colorarea mai intensă decît citoplasma înconjurătoare cu ajutorul coloranților anionici (acizi). Coloranții anionici cum sînt fuxina și albastrul de metil au o puternică afinitate pentru cromatină, fiind frecvent folosiți pentru colorarea cromatinei. Cantitatea de colorant pe care o reții diferiți constituienți celulari se datorește numărului de grupări acide sau bazice, capabile să se atașeze de coloranții acizi sau bazici (Baker, 1969).

7.1.3. PENETRAȚIA COLORANȚILOR

Cantitatea de colorant reținută de un obiect, într-un anumit timp nu depinde numai de cantitatea de material colorabil sau de numărul de grupări acide sau bazice ci și de cantitatea de colorant care pătrunde în țesut. Sînt coloranți care pătrund în țesut cu o viteză mare, cum sînt cosina și orange G și alții care difuzează mai lent (albastru de metil). Coloranții care difuzează cu viteză mai mare disolvă un singur ion iar cei care pătrund mai lent au tendința de a forma soluții coloidale, în care fiecare particulă constituie un agregat format din mai mulți ioni.

Intensitatea colorării depinde de permeabilitatea constituienților celulari și de afinitatea chimică. De exemplu, cromatina are o structură densă, permeabilă și are o reacție bazofilă, colorîndu-se ușor cu coloranții cationici, în timp ce hematiile au o reacție acidofilă, structură densă și impermeabilă (Baker, 1969).

Coloranții anionici pătrund ușor în țesut și au tendința de a colora toți constituienții celulari acidofili și amfoteri. Constituienții celulari se colorează uniform, iar prin colorarea cromatinei cu ajutorul unui colo-

rant cationic se creează contrastul necesar unei bune observații. Albastru de metil sau alt colorant anulează efectul dat de coloranții cationici. Se recomandă folosirea unui colorant a cărei culoare este apropiată de centrul spectrului vizibil (galben sau verde), culoare care stimulează în aceeași măsură receptorii din retină, rezultînd o culoare pal, ceea ce dă impresia că este combinată cu alb. Orange G este un colorant adecvat. În schimb cromatina prezintă o culoare apropiată de sfîrșitul spectrului (roșu, albastru, violet). Dacă cromatina este colorată în negru sau gri, orice colorant de fond reduce contractul indispensabil unei bune observații (B a k e r, 1969).

Coloranții sînt clasificați în grupe, în funcție de cromatoforii ce intră în constituția lor. Cele mai multe dintre aceste grupe conțin atît coloranți cationici cît și anionici — conținînd auxocromii menționați.

Culoarea marii majorități a coloranților folosiți în tehnicile de laborator este determinată de inelul guinonoid sau grupul azo — N = N —

Coloranții guinonici, fiind foarte diverși au fost clasificați în subgrupe, fiecare caracterizată de cromoforul particular.

7.2. TEHNICI DE PREPARARE ȘI UTILIZARE A COLORANȚILOR CITOHISTOLOGICI

Numărul coloranților utilizați de citologie este impresionant, cei prezentați în continuare reprezintă o selecție a celor mai utilizați.

1. *Albastru de metilen*

albastru de metilen . . . . . 1 g
alaun de potasiu . . . . . 10 g
apă distilată . . . . . 100 ml

2. *Carmin acetic*

carmin . . . . . 1,0 g (sau 2)
acid acetic glacial . . . . . 45 ml
apă distilată . . . . . 55 ml

Se dizolvă carminul în amestecul apă distilată—acid acetic glacial. Soluția obținută se introduce într-un balon de sticlă cu reflux și după o prealabilă agitare se fierbe timp de cîteva minute. După răcire, se filtrează și se adaugă cîteva cristale de acetat de fier. Se păstrează în sticle colorate, la frigider.

Carminul acetic se folosește pentru colorarea nucleului și a cromozomilor.

3. *Carminul aceto-feric* (B e l l i n g) este recomandat de Kühne pentru studiul citologic al ciupercilor superioare. Nucleii se colorează în roșu. Carminul aceto-feric produce o fixare și colorare simultană și rapidă. Reactivul se prepară saturînd cu carmin soluția apoasă de acid acetic 50%. Colorarea se realizează astfel : secțiunile se pun într-o picătură de colorant pe lamă și se încălzește 1—2 minute, evitînd fierberea. În colorant se introduce vîrful unui ac spatulat de oțel. Acesta este atacat de reactiv și se transformă în acetat de fier, de culoare neagră. În acest moment se întrerupe încălzirea preparatului. Se adaugă o picătură

de carmin acetic, se așează lamela și după etalarea și îndepărtarea excesului de colorant, preparatul poate fi examinat la microscop.

4. *Carmin-alaun* (G r e n a c h e r)

carmin	2 g
alaun de potasiu	4 g
apă distilată	100 ml

Modul de preparare. Se adaugă 4 g alaun de potasiu în 100 ml apă distilată. Se adaugă 2 g carmin și se fierbe 20—30 minute. Se răcește și filtrează. Se adaugă 1 ml formol sau puțin timol. Se păstrează în sticle colorate. Se folosește pentru colorarea nucleului.

5. *Metoda Varga-Andrias*

Colorarea cu carmin-acetic dă rezultate mult mai bune prin prelucrarea materialului după metoda preconizată de Varga-Andrias Materialul se fixează în Carnoy, după care se introduce pentru 5 minute într-un amestec format din alcool etilic absolut-acid clorhidric concentrat, în proporție de 1 : 1, pentru macerare. După macerare, materialul se transferă într-un vas cu soluție Chamberlain timp de 5—10 minute.

acid acetic glacial	5 ml
formol 4%	5 ml
alcool etilic absolut	70 ml
apă distilată	20 ml

Soluția Chamberlain solubilizează amidonul care are proprietatea de a absorbi carminul, împiedicînd astfel colorarea excesivă a cromozomilor.

Tehnica de colorare constă în următoarele : din soluția Chamberlain materialul este transferat din nou în fixator Carnoy, timp de 2—3 minute după care se trece în colorant. Colorarea se poate realiza în capsule de porțelan sau direct pe lamă. Pentru intensificarea culorii se recomandă încălzirea preparatului la flacăra unei lămpi cu spirt, evitînd fierberea. Materialul se pune pe lamă, într-o picătură de carmin acetic ; se acoperă cu lamela și se face o ușoară etalare prin presare cu degetul mare.

Pentru conservarea preparatului un timp mai îndelungat, după efectuarea lui, se introduc sub lamelă 1—2 picături de soluție S m i t h :

apă distilată	55 ml
glicerină pură	8 ml
gumă arabică	25 g
clorat hidrat	10 g

Cu o hîrtie de filtru se absoarbe soluția colorantă iar pe partea opusă se adaugă soluția S m i t h.

Soluția Smith asigură conservarea preparatului și în același timp o invizibilizare a precipitatului ce se formează în celule.

6. *Deltapurpurina* — se utilizează pentru evidențierea miceliilor ciuperci endoparazite. Secțiunile prin organele atacate se tratează mai întîi cu hipoclorit de sodiu, 15 minute ; se spală în apă distilată 20 minute după care se colorează cu deltapurpurina timp de 10 minute. Micelile, hustorii, oogoanele, anteridiile și oosporii se colorează în roșu intens.

7. *Eosina* — se utilizează soluții apoase 0,5—1%. Se folosește și în amestecuri cu coloranți bazici (albastru de metilen) cu care dă eozinați.

ce se întrebuințează pentru colorarea sîngelui. Eosina este un colorant plasmatic, foarte **selectiv.**

8. *Eritrosina glicerinată*

eritrosina — soluție apoasă 1%	50 ml
glicerină pură	100 ml
apă distilată	50 ml

Se utilizează pentru colorarea micelilor ciupercilor. Materialul este introdus în eritrosină glicerinată pentru 20 minute după care se transferă în glicerină 50% în care se lasă **1—2 zile.**

9. *Floroglucina*

floroglucina	1 g
alcool etilic 96% (sau absolut)	100 ml

Se utilizează pentru colorarea țesuturilor lignificate. Acestea se colorează în roșu. Secțiunile se introduc pentru 1—5 minute în floroglucină după care sînt transferate pentru cîteva secunde în acidul clorhidric.

10. *Fuxină bazică decolorată* (Reactivul Schiff)

fuxină — pulvis	0,5 g
apă distilată	100 ml
acid clorhidric normal	10 ml
metabisulfit de potasiu (cristale)	1—2 g

Modul de preparare. Se iau 0,5 g fuxină și se pun într-un vas de sticlă uscat și curat, peste care se toarnă 100 ml apă fiartă. Se continuă fierberea, împreună 2—3 minute la foc slab, pînă se ridică spumă. Se lasă să se răcească la 50°C și se filtrează. Se adaugă 10 ml HCl normal și cîteva cristale de metabisulfit de potasiu $K_2S_2O_5$. Se păstrează la frigider 15—24 ore. Dacă soluția de fluxină este colorată se adaugă 0,5 g cărbune vegetal pentru limpezire și decolorare. Se poate folosi după 24 ore de la preparare. Fuxina bazică decolorată se păstrează în sticle colorate cu dop rodat, în frigider.

1. *Metoda de colorare Gram-eosină*

Secțiunile păstrate în alcool etilic 96° se colorează cu o soluție de violet de gentiană a cărei compoziție este :

violent cristal (sau violet de gențiană)	1 g
alcool etilic 96°	10 ml
acid fenic cristalizat	2 g
apă distilată	100 ml

Modul de preparare. Violetul cristal (violet de gențiana) se mojarează și se dizolvă în alcool. Treptat se adaugă acidul fenic. În momentul în care se obține un amestec omogen se adaugă apa. Soluția obținută este lăsată pentru maturare 24 ore, după care se filtrează și se poate folosi pentru colorarea secțiunilor. Secțiunile colorate sînt spălate în apă distilată și cufundate în soluție de iod în iodură de potasiu (soluție Lugol)

iod metalic	1 g
iodură de potasiu	2 g
apă distilată	1000 ml

Se efectuează o nouă spălare în alcool etilic absolut și apă și se recolorează cu eosină 1%. Se spală cu apă, se deshidratează și se montează în balsam de Canada.

12. *Hematoxilina Erlich*

hematoxilina ferică cristalizată	2 g
alcool etilic absolut	100 ml
acid acetic glacial	10 ml
glicerină pură	100 ml
alaun de potasiu	3 g
apă distilată	100 ml

Aceste componente se amestecă și se lasă într-un vas descoperit pînă cînd soluția obținută capătă o culoare roșie-închisă. După aceasta se transferă în sticle brune și se păstrează la întuneric. Hematoxilina Erlich are avantajul de a se matura foarte repede. Metoda de colorare preconizată de Erlich are avantajul că materialul nu necesită mordasarea și diferențierea, iar colorarea se realizează în cîteva minute.

13. *Hematoxilina ferică* (Heidenheim)

hermatoxilina ferică (cristale)	0,5 g
apă distilată	100 ml
timol (antiseptic)	cîteva cristale

Se recomandă să se prepare o soluție mamă (stoc) 1% sau 10% din care să se prepare soluția de colorare.

Soluția de hematoxilină 10% se prepară din :

hematoxilină ferică	10 g
alcool etilic 95%	100 ml
timol (antiseptic)	cîteva cristale

Soluția de hematoxilină 10% se lasă să se matureze 2—3 săptămîni. după care se poate utiliza pentru prepararea soluțiilor de colorare 0,5 sau 1%.

soluție mamă (stoc)	5 sau 10 ml
apă distilată	90 ml

În momentul preparării soluția este brun-roșietică, iar după un anumit timp devine brună-negricioasă. Soluția este cu atît mai bună cu cît este mai veche.

Schrott recomandă următorul procedeu pentru prepararea unei soluții de hematoxilină care să poată fi utilizată imediat, fără să fie nevoie de maturizarea ei : se dizolvă un gram de hemeatoxilină cristalizată în 95 ml apă distilată prin fierbere lentă la un foc slab. Cînd dizolvarea este completă se adaugă 5 ml de acid fenic. După răcire soluției astfel pregătită poate fi folosită pentru colorare.

Se utilizează pentru colorarea nucleilor interfazici și în diviziune. Nucleii se colorează în 30 minute în timp ce pentru diferențierea altor structuri citoplasmatice colorarea trebuie prelungită la 12—24 ore. Calitatea colorării depinde în mare măsură de modul în care s-a făcut mordansarea materialului și se aplică tehnica de diferențiere. Diferențierea se realizează printr-o urmărire atentă și continuă a preparatelor la microscop. Cu hematoxilină nucleul se colorează în albastru pînă la albas-

tru-negru, în funcție de timpul de colorare și gradul de diferențiere. După colorare secțiunile se spală în apă de robinet, la jet continuu, timp de 12 ore.

Hematoxilina ferică (Heidenheim) este unul din cei mai buni coloranți pentru evidențierea nucleului și cromozomilor, pe care-i pune în evidență cu o deosebită claritate. Este un colorant puternic și durabil, dînd o colorație precisă și ușor de analizat la microscopul optic.

14. *Hematoxilina ferică* (metoda Regaud)

hematoxilină — soluție alcoolică 10%	10 ml
glicerină pură	10 ml
apă distilată	80 ml

Înainte de colorare materialul se mordansează în alaun de fier 5% timp de 24 ore și se spală cu apă distilată. Colorarea se realizează în 24—48 ore. Se recomandă utilizarea pentru colorarea condriomului.

15. *Hemalaunul Mayer*

Soluția A

hematoxilina	5 g
alcool etilic 96%	50 ml

Soluția B

alaun de potasiu	37,5 g
apă distilată	500 ml

Se iau 7,5 ml din soluția A și se amestecă cu soluția de alaun de potasiu încălzită și filtrată în prealabil. Se adaugă o soluție ce se prepară din 15 ctg iodat de potasiu și 50 ml apă distilată. Se lasă trei zile pentru maturare. Aceasta constituie soluția mamă. La utilizare se adaugă 0,5 ml acid acetic glacial la 100 ml soluție de colorat. Este utilizat pentru colorarea nucleului.

16. *Soluția de iod în iodură de potasiu* (I. IK)

Se folosesc trei variante, în privința concentrației

1. iod metalic cristalizat	1 g
iodură de potasiu	4 g
apă distilată	300 ml
2. iod metalic (cristale)	1 g
iodură de potasiu	3 g
apă distilată	100 ml
3. iod metalic (cristale)	4 g
iodură de potasiu	6 g
apă distilată	100 ml

Modul de preparare: Se dizolvă iodura de potasiu în puțină apă distilată, după care se adaugă cristale de iod. Se agită pînă la dizolvarea completă și se adaugă restul de apă. Se păstrează în sticle brune, la întuneric.

Concentrația soluției se stabilește în funcție de natura materialului luat în studiu și de scopul urmărit. Se utilizează pentru evidențierea granulelor de amidon cloroplaste, prin colorarea lor în maron-galben I. IK indiferent de proporția iodului și a iodurii de potasiu, se folosește și ca fixator, avînd proprietatea de a păstra nealterată structura celulei.

Pentru punerea în evidență a condriomului, Lenar a folosit un amestec format din părți egale de iod în iodură de potasiu soluție alcoolică 2% și acid clorhidric 2%.

Soluția alcoolică de iod în iodură de potasiu se prepară astfel: se dizolvă 1 g de iod în 100 ml alcool etilic 80% după care se dizolvă 1 g de iodură de potasiu. Acest amestec este foarte instabil, devenind brun datorită punerii în libertate a iodului care după cîteva zile precipită în cristale. Se recomandă să se prepare înainte de folosire.

17. *Metoda de colorare a lui Lepik* — este utilizată pentru evidențierea miceliilor ciupercilor endoparazite. Secțiunile se tratează cu o soluție de lactofenol, cu următoarea compoziție:

acid fenic cristalizat	10 g
acid lactic	10 ml
glicerină pură	20 ml
alcool etilic 90°	20 ml

După 15 minute secțiunile sînt transferate în următorul amestec colorant, în care sînt lăsate 2 ore:

bleu coton 4 B_2	0,02 g
safranină	0,1 g
lactofenol	100 ml

Secțiunile se spală în alcool etilic 96° și alcool etilic absolut. După spălare se introduc într-un amestec format din:

safranină	0,1 g
ulei de garoafe (Eugenol)	50 ml

Se lasă în acest mestec 20—30 minute, iar după trecerea prin 2—3 băi de xilol (benzen) se montează în balsam de Canada.

Miceliul și fructificațiile ciupercilor se colorează în albastru, iar țesuturile plantei gazdă în roz.

18. *Nigrosină acetică*

nigrosină	20 g
acid acetic glacial	250 ml
apă distilată	250 ml

Se fierb împreună apa distilată și acidul acetic glacial. La temperatura de 100°C se adaugă nigrosina și se fierb în continuare 8 minute. Se lasă să se răcească și se filtrează. Colorantul se păstrează în sticle colorate și la rece. Se recomandă ca soluția să fie lăsată pentru maturare cel puțin 17 zile. Se folosește pentru colorarea cromozomilor.

19. Orange G. (sarea de sodiu a acidului sulfuric al benzennaftolului). Se folosește soluția apoasă de 1%. Prezintă o solubilitate de 10,86 g la % în apă, la 26°C și 0,22 la % în alcool. Este un colorant plasmatic, de contrast selectiv după colorare cu hematoxilină. Protoplasma se colorează în roșu-roz. Secțiunile sînt ținute 5—10 minute în soluție apoasă 1% de Orange G.

20. *Orceină acetică*

orcină	2,0 g
acid acetic glacial	100 ml

Modul de preparare: orceina se dizolvă în acid acetic glacial încălzit şi se continuă fierberea timp de cîteva minute. Se răceşte şi se filtrează. Se păstrează la frigider în sticle colorate. Aceasta constituie soluţia mamă (rezervă). Pentru colorare se utilizează o soluţie diluată cu următoarea compoziţie:

orceină (soluţie de rezervă — mamă)	45%
apă distilată	55%
Orceină propionică	
orceină	1 g
acid propianic	45 ml
apă distilată	55 ml

Se prepară în mod asemănător orceinei acetice.

21. *Rezorcină acetică.*

rezorcină	2,2 g
acid acetic glacial	100 ml

Se introduce rezorcina în acidul acetic glacial şi se fierbe pînă se dizolvă complet. Se lasă să se răcească şi se filtrează. Se păstrează în sticle colorate. Pentru obţinerea unor rezultate superioare se recomanda prepararea în momentul utilizării şi numai în cantitatea necesară. Aceasta constituie soluţia standard. Pentru colorare se prepară o soluţie mai diluată, cu următoarea compoziţie:

rezorcină acetică (soluţie de rezervă)	45 ml
apă distilată	55 ml

Se foloseşte pentru colorarea cromozomilor.

22. *Roşu de ruteniu.*

roşu de ruteniu	0,5 g
apă distilată	100 ml

23. *Sudan III.*

Se foloseşte o soluţie alcoolică.

1. sudan III	0,1 g
alcool etilic 70—95%	20 ml
2. sudan III	0,1 g
alcool etilic 70—95%	10 ml
glicerină pură	10 ml

Secţiunile se încălzesc pînă la fierberea alcoolului. Ţesuturile subcrificate, grăsimile, răşinile şi cutina se colorează în roşu. Pentru colorarea lipidelor se recomandă folosirea soluţiei de Sudan III în lactofenol, ce se prepară prin saturarea prin fierbere a lactofenolului cu Sudan III. După răcire se filtrează şi se păstrează în sticle colorate, ermetic închise. Se foloseşte pentru evidenţierea lipidelor din celulele ciupercilor. Pentru acelaşi scop se mai poate folosi amestecul format din 100 ml alcool etilic 70% şi 0,2—0,3 g Sudan III.

24. *Tinctura de Alkana.* Se folosesc 10 g pulbere de rădăcini de Alkana peste care se toarnă 30 ml alcool etilic absolut. Se lasă o zi, timp în care principii activi din rădăcină se dizolvă în alcool, după care se filtrează. Se introduce în termostat sau se plasează sub un bec electric pentru evaporarea alcoolului. Reziduu este dizolvat în 5 ml de acid acetic glacial. Se adaugă 50 ml apă şi alcool etilic 50 ml. După 24 ore se filtrează.

25. *Violet de gentiana*

violet de gentiana (pulvis)	1 g
acid acetic — soluție apoasă 2%	100 ml

Modul de preparare. Violetul de gentiana sub formă de pulvis se dizolvă în soluție apoasă de acid acetic 2%, pînă se obține o soluție de culoare violet deschis.

Se utilizează pentru colorarea nucleului.

26. *Verde de malachit*

verde de malachit	0,01 g
apă distilată	100 ml

Se întrebuințează pentru colorarea membranelor celulare.

27. *Verde de metil.*

verde de metil	1 g
apă distilată	100 ml
acid acetic glacial	1 ml

Se utilizează pentru colorarea nucleului. Este colorant nuclear progresiv, colorarea se realizează instantaneu. Se folosește atît ca, colorant cît și ca fixator.

28. *Acidul iodo-osmic* (Iodoosmium Sawe).

acid osmic	0,5 g
iodură de potasiu	0,1 g
iod	0,3 g
apă distilată	25 ml

Datorită acțiunii toxice a acidului osmic se recomandă prepararea, manevrarea și utilizarea cu multă atenție. Se utilizează ca fixator al condriomului. De asemenea, acidul osmic din compoziția fixatorului evidențiază cu multă claritate substanțele lipidice. Refringența mai pronunțată a picăturilor lipidice permite să le deosebim cu mare ușurință de condriom.

29. *Albastru de metilen și roșu de ruteniu.*

Albastru de metilen

Albastru de metilen	1 g
Alaun de potasiu	10 g
apă distilată	100 ml

Roșu de ruteniu

roșu de ruteniu	0,5 g
apă distilată	100 ml

Secțiunile se introduc în albastru de metilen pentru 5—10 minute, se spală în apă, după care se trec în soluție de ruteniu, pentru 5—10 minute. Se realizează o colorare diferențiată. Sclerenchimul se colorează în violet, lemnul în albastru, suberul în verde, parenchimul și țesutul liberian în roz-roșu.

30. *Clorura de zinc iodată.*

1. clorura de zinc	2 g
iodura de potasiu	6 g

iod metalic cristalizat	1,3 g
apă distilată	10,5 ml
2. clorura de zinc	50 g
iodură de potasiu	16 g
iod metalic cristalizat	3 g
apă distilată	17 ml

Modul de preparare : se dizolvă în apă distilată mai întîi clorura de zinc și iodura de potasiu și numai după aceea se adaugă iodul metalic. Soluția care se obține are o consistență siropoasă și o culoare galben-brună.

Se păstrează în sticle brune. ermetic închise.

Se utilizează pentru colorarea membranelor, protoplasmei și nucleului. Membranele celulozice și nucleii se colorează în albastru. Membranele cutinizate și protoplasma în galben. Colorarea se efectuează pe lamă. Secțiunile sînt trecute pe o hîrtie de filtru, pentru a se îndepărta excesul de apă și sînt transferate pe lamă și tratate cu o picătură de colorant.

Clorura de zinc iodată se mai poate prepara și astfel : zincul se dizolvă în acid clorhidric. Soluția obținută se fierbe pentru a se realiza o evaporare parțială, pînă cînd lichidul capătă greutatea specifică 2 (totdeauna zincul se lasă în exces). Se adaugă apă distilată pînă cînd lichidul capătă greutatea specifică 1,8. Se adaugă iodura de potasiu și iod metalic. Acest amestec se încălzește pînă se formează vapori de iod de culoare violetă.

31. *Eritrosina și albastru de toluidină.* Se utilizează pentru evidențierea micelilor din țesuturile plantelor parazitate. Secțiunile se introduc într-o soluție de eritrosină 0,1% pentru 15 minute, după care se spală în apă și se transferă în soluție apoasă de albastru de toluidină 1%. 1—2 minute. Se spală din nou în apă și se diferențiază în apă acidulată 0,2% (cu acid acetic) pînă cînd micelul devine albastru, iar fondul țesuturilor roz. Secțiunile se deshidratează și se montează în balsam de Canada.

Eritrosina poate fi înlocuită cu un amestec format din :

eritrosină	0,2 g
orange G	1 g
apă distilată	100 ml

32. *Fuxina și verde de metil.* Se prepară soluții alcoolice de fuxină și verde de metil și se amestecă, turnînd verde de metil peste fuxină pînă se realizează un lichid de culoare violetă. Acest amestec se mai poate prepara astfel : se dizolvă simultan în apă distilată fuxina și verde de metil pînă ce amestecul capătă o culoare violet închis. Se adaugă cîteva picături de acid acetic glacial. Cu acest amestec se realizează în același timp atît hidroliza cît și colorarea materialului. Nucleii se colorează în verde albăstrui, protoplasma în roz intens. După colorare secțiunile se spală în apă și se montează în glicerină.

Se utilizează, de asemenea, pentru colorarea membranelor celulare. Acestea se colorează în verde sau albastru, a perilor staminali de la Tradescantia și a celulelor epidermice ale frunzelor de ceapă. Se poate studia formarea și structura anterozoizilor.

33. *Iodo-clorhidratul Mayer.* Se prepară prin dizolvarea a 5 g clorhidrat în 2 ml apă distilată. Soluția obținută se saturează în iod. Se păstrează în sticle brune la întuneric. Preparatele trebuiesc examinate imediat, deoarece clorhidratul distruge rapid grăunciorii de amidon pe care iodul îi evidențiază prin colorare.

34. *Metoda de colorare a lui Mann,* se folosește pentru evidențierea în special, a micelilor din țesuturile plantelor paraziate, prin colorare cu eritrosină și albastru de toluidină. Secțiunile se colorează în soluție apoasă de eritrosină 0,1% pînă se obține o colorare roză (15 minute). Se spală cu apă și se recolorează cu o soluție apoasă de albastru de toluidină 1% timp de 1—2 minute. Se spală din nou în apă. Se diferențiază în apă acidulată 0,2% (cu acid acetic), pînă cînd micelul devine albastru, iar fondurile țesuturilor roz. Se deshidratează și se montează în balsam de Canada. Eritrosina poate fi înlocuită cu un amestec format din :

eritronisă	0,2 g
orange G	1,0 g
apă distilată	100 ml

35. *May-Grunwald-Giemsa*

Soluția A

May-Grunwald pulvis	0,08 g
Giemsa pulvis	0,16 g
alcool metilic	100 ml

Soluția B

violet de gentiana	0,02 g
albastru de toluidină	0,02 g
alcool metilic	100 ml

Soluția A se amestecă cu soluția B în raport de 3 : 1. Colorantul obținut se dilouează cu apă tamponată, pH 7,2, în proporție de 1 : 4.

36. *Roșu de Congo și crisoidină (reactivul Genevez).*

Se utilizează crisoidină și roșu de Congo, ce se prepară astfel :

Crisoidina

1. crisoidină	1 g
alcool etilic absolut	100 ml
2. crisoidină	0,5 g
apă distilată	100 ml

Roșu de Congo

1. roșu de Congo	3 g
apă distilată	100 ml
amoniac	5 ml
2. roșu de Congo	1 g
apă distilată	100 ml
amoniac	cîteva picături

Colorantii astfel preparați, sînt lăsați în repaus 1—2 zile, la temperatura camerei, pentru dizolvarea completă a substanțelor după care se amestecă în părți egale. Se lasă, din nou, în repaos 2 zile și se filtrează. Se utilizează pentru colorarea membranelor celulare. Membranele celulozice se colorează în roșu, cele lignificate în galben sau portocaliu, în timp ce cele cutinizate în galben-auriu. Se obține o culoare de calitate superioară în cazul fixării materialului cu alcool acetic.

37. *Verde de iod și fuxină.* Se amestecă o soluție apoasă de verde de iod 0,1%, cu o soluție concentrată de fuxină, în proporție de 9 : 1. Secțiunile (materialul) sînt lăsate în acest amestec cca 10 minute, după care se diferențiază în alcool absolut la care se adaugă acid acetic glacial și 0,1% iod. Se realizează o dublă colorare. Citoplasma se colorează în roșu deschis, nucleolii în roșu închis, iar cromatina devine albastră. Acest amestec este instabil și se recomandă să se prepare în momentul utilizării.

38. *Roșu Magdala și Verde de lumină.* Metoda de colorare cu roșu de Magdala și Verde de lumină a fost elaborată de A l t m a n n pentru evidențierea miceliilor din țesuturile infestate. Se procedează în felul următor : secțiunile se țin în fixatorul Flemming 15—20 minute, iar după ce se spală cu apă timp de 20—30 minute se introduc în soluție apoasă 0,25% roșu de Magdala, pentru un timp ce variază de la 1 minut la 24 de ore. Intensitatea colorării se controlează la microscop și se întrerupe în momentul obținerii coloratiei dorite. Excesul de colorant se poate îndepărta prin spălarea în apă, timp de 5 minute și alcool etilic absolut timp de 30 secunde. Micelille se colorează în roșu. În continuare secțiunile sînt transferate în soluție 0,3% de verde de lumină, preparată în ulei de cuișoare, în care sînt ținute pînă în momentul în care țesuturile plantei gazdă se colorează în verde. Secțiunile se montează în balsam de Canada.

39. *Safranină și albastru de metilen :* Secțiunile se trec prin seria de alcool și se introduc pentru colorarea în soluție alcoolică de safranină, ce se prepară prin amestecarea în părți egale a safranin i cu alcool etilic absolut. După colorare, secțiunile sînt trecute în acidul clorhidric, în care se lasă pînă rămîn colorate numai țesuturile lignificare și cutinizate. Se spală cu apă de robinet și se recolorează cu albastru de metilen 1%. Se spală cu apă ; se deshidratează și se montează în balsam de Canada. Celuloza se colorează în albastru iar lemnul, suberul și cutina în roșu.

40. *Metoda colorării cu Verde de iod și carmin :*

Soluțiile colorate se prepară astfel :

1. *Verde de iod*

verde de iod	1 g
apă distilată	100 ml
acid acetic glacial	3—4 ml
timol	1—2 cristale

2. *Carmin-alaun*

carmin	1 g
alaun de potasiu	1 g
apă distilată	100 ml

Modul de preparare : Carminul și alaunul se dizolvă prin fierbere timp de 30 minute. Se lasă să se răcească și se filtrează.

Pentru obținerea soluției de carmin se mai poate utiliza și următorul procedeu. Se face o soluție apoasă concentrată de alaun de potasiu, prin dizolvarea la cald. La un litru de soluție de alaun astfel pregătită, se adaugă 2 linguriță de carmin. Se fierb în clocot împreună,

15—20 minute iar după răcire se filtrează. Se adaugă 1—2 cristale de timol ca antiseptic.

Colorarea se efectuează astfel : secțiunile javelizate și spălate în apă distilată acidulată sînt trecute un timp ce variază de la cîteva secunde la un minut, în soluție de verde de iod 1%. Întreruperea colorării se face prin transferarea bruscă a secțiunilor în alcool 90°. Prin această operație se îndepărtează totodată excesul de colorant din țesuturi. Alcoolul este îndepărtat prin trecerea în continuare a secțiunilor în 3—4 vase cu apă distilată. Colorarea se efectuează prin introducerea secțiunilor în soluție de carmin, unde sînt lăsate 10—20 minute în funcție de intensitatea dorită. Se spală în apă distilată și alcool iar după trecerea prin alcool și xilol, se montează în balsam de Canada.

Pentru a scurta durata colorării, cele două soluții se pot amesteca în proporție de 1 ml soluție de verde de iod la 10 ml soluție de carmin-alaun. În acest fel dubla colorare se realizează simultan în cca 5 minute.

Pentru colorarea diferențiată a unor constituienți celulari se recomandă efectuarea unor colorări mixte, prin utilizarea a doi sau mai mulți coloranți.

41. *Tripla colorare a lui Strasburger*

Se realizează cu un amestec de trei coloranți : safranină, violet de gentiana, orange G.

1. *Safranină :*
   safranină . . . . . 1 g
   alcool etilic absolut . . . . . 100 ml
   apă de anilină . . . . . 3—4 picături
2. *Violet de Gentiana*
   violet de gentiana . . . . . 1 g
   apă distilată . . . . . 100 ml
3. *Orange G*
   orange G . . . . . 0,2 g
   apă distilată . . . . . 100 ml

Tripla colorare a lui Strasburger se utilizează în cazul fixării în lichidul Flemming.

Modul de lucru : Secțiunile ținute într-o soluție de alcool 96° sînt trecute în soluție de safranină 1% pentru 12 ore. Se spală în apă distilată și se diferențiază cca un minut într-un amestec format din alcool 70° și 0,1 acid clorhidric N/2. Se spală din nou în alcool etilic absolut și apă și se colorează în violet de gentiana (2 minute) și Orange G (10—60 secunde). Se spală în alcool etilic absolut și se diferențiază în esență de garoafe (Eugenol) timp de 10 minute. Se îndepărtează uleiul de garoafe prin spălare cu xilol sau toluen și se montează în balsam de Canada sau euparal.

8. REALIZAREA UNOR PREPARATE CITO-HISTOLOGICE DE CORMOPHYTAE

Cormophyta — reprezintă a doua unitate mare taxonomică a regnului vegetal în care sînt încadrate plantele superioare, grupate în trei filumuri : *Pteridophyta, Gymnospermae, Angiospermae*. Cele trei unități sistematice, deși se individualizează prin caractere majore, proprii, au însă un caracter esențial comun și anume, cormul.

Cormul — aparatul vegetativ caracteristic plantelor superioare — se deosebește radical de tal, prin apariția organelor vegetative și a țesuturilor adevărate. Prezența în structura cormului a țesuturilor conducătoare denotă un salt evolutiv pe care aceste plante l-au realizat pe măsura emancipării lor treptate de la mediul acvatic la cel aerian terestru.

La Spermatofite apare, de asemenea, un nou organ reproducător, complex — floarea.

Datorită complexității structurale a cormului, cercetarea citohistologică a organelor vegetative și reproducătoare nu mai poate fi realizată pe baza unor preparate „in toto" ; este necesară o prelucrare suplimentară a materialului din care nu poate lipsi operația de secționare sau de etalare a acestuia. Secțiunile se pot realiza cu briciul „de mînă" sau la microtomul mecanic. Prin urmare, pe baza acestor considerente, preparatele pot fi grupate în trei categorii : preparate „de mînă", preparate realizate prin includerea în parafină a materialului și secționarea acestuia la microtomul mecanic și preparate de tip „squash". Întrucît tehnica includerii în parafină și metoda Feulgen rapidă sînt expuse în alte capitole ale lucrării (v. pag. 162, 194), în continuare vom face o succintă prezentare a tehnicii de realizare a preparatelor „de mînă".

Preparate „de mînă". Preparatele de acest gen, prin calitățile lor satisfac exigențele didactice și chiar științifice ; pentru că sînt mai ușor de realizat, cu un minim de materiale și ustensile, sînt adesea preferate înaintea celora obținute prin tehnica împarafinării.

Pentru obținerea unor preparate microscopice se parcurg următoarele etape succesive : fixarea, secționarea, colorarea și montarea. Tehnica poate fi complicată sau simplificată în funcție de material și scopul urmărit.

Materialul se selectează în funcție de sarcinile didactice sau științifice ; menționăm cîteva dintre cele mai utile materiale în predarea

botanicii : rădăcini și tulpini de ferigi — pentru evidențierea anatomiei acestor organe și pentru demonstrarea evoluției stelului ; rădăcini de *Ranunculus* sp. și *Iris* sp. — pentru evidențierea structurii primare a rădăcinii de la *Dicotyledoneae* și *Monocotyledoneae ;* rădăcini de *Vicia faba* și rădăcini adventive de *Nerium oleander* — pentru structura secundară a rădăcinii ; tulpini de *Ranunculus, Pisum sativum* și *Zea mays* — pentru evidențierea structurii primare a acestui organ ; ramuri de unul, doi și trei ani de *Tilia sp.* — pentru a demonstra structura secundară a tulpinii ; frunze de *Prunus sp.* și *Fagus sylvatica* pentru structura dorsiventrală și frunze de *Iris sp.* — pentru structura unifacială a acestor organe ; strobili de *Selaginella helvetica,* conuri ♂ și ♀ de *Pinus silvestris, Abies alba* sau *Picea excelsa,* flori, semințe și fructe de la *Angiospermae,* la care se mai pot adăuga multe altele.

Fixarea — se realizează în unul din fixatorii adecvați menționați la pag. 108—135 (Uneori se poate renunța la fixare).

Secționrea — Materialele proaspete sau în prealabil fixate, pentru a putea fi analizate trebuie secționate. În funcție de organ și de ceea ce dorim să evidențiem se pot executa trei tipuri de secțiuni : *transversale* (planul secțiunii este perpendicular pe axul longitudinal al organului), *longitudinal-radiare* (planul secțiunii este paralel cu axul longitudinal al organului, trecînd prin centrul său) și *longitudinal-tangențiale* (planul secțiunii este tot paralel cu axul longitudinal al organului, dar nu trece prin centrul său) (fig. 61).

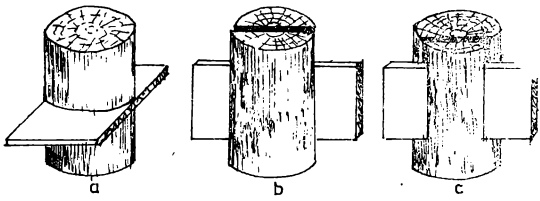


Fig. 61 — Tipuri de secțiuni : a — transversală ; b — longitudinal-radiară ; c — longitudinal-tangențială.

În starea în care au fost recoltate pot fi secționate numai organele care au o anumită consistență naturală. Cele moi vor fi în prealabil parțial deshidratate prin cufundare în alcool 70%, timp de 6—24 de ore (sau mai mult) pentru a le conferi o anumită rigiditate. Alte materiale, proaspete sau conservate pe cale uscată, fiind prea tari, de asemenea, nu pot fi secționate ; acestora li se va aplica un tratament preliminar, care constă în fierberea lor în apă distilată, în apă acidulată sau glicerină timp de 10—60', în funcție de grosimea și de particularitățile anatomice ale materialului, pentru a reda țesuturilor o oarecare elasticitate.

Piesele moi sau mici nu pot fi ținute singure în mînă pentru a fi secționate ; de aceea se recurge la cuprinderea lor între două jumătăți longitudinale de măduvă de soc sau măduvă de floarea soarelui. În lipsa acestora se poate utiliza, cu bune rezultate, polistirenul expandat. Materialul se orientează în poziția dorită între cele două jumătăți, fixate prin strîngerea lor între degetele mîinii sau prin legare cu ață subțire (fig. 62), după care se poate trece la secționarea propriu-zisă.

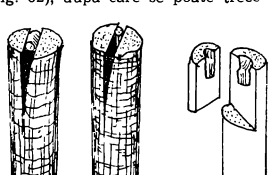


Fig. 62 — Pregătirea măduvei de soc și orientarea materialului în vederea secționării.

Materialul ce urmează a fi secționat se ține în mîna stîngă, iar briciul anatomic în mîna dreaptă. Secționarea se face printr-o singură mișcare lentă și continuă a briciului, de la periferia obiectului spre executor și de la stînga la dreapta, dîndu-i o înclinație de 45° (fig. 63). Secțiunile

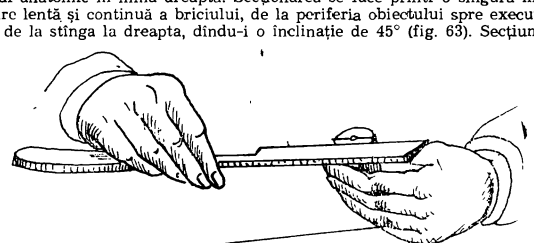


Fig. 63 — Executarea secțiunilor cu briciul de mînă.

se culeg de pe lama briciului cu o pensulă fină și moale înmuiată în apă și se depun într-un vas cu apă. După realizarea unui număr suficient de secțiuni se trece la trierea lor. În acest scop se pun pe lamă mai multe secțiuni, dintre care, după analiza microscopică a fiecăreia în parte, se reține numai cele reușite. Pentru a fi considerate bune, secțiunile trebuie să îndeplinească două condiții esențiale și anume : să fie cît mai subțiri (3—30 μ) și să fie perfect perpendiculare sau paralele în raport cu axul longitudinal al organului secționat.

Secțiuni mai fine și mai uniforme se pot obține cu ajutorul microtomului de mînă (fig. 64). În acest scop materialul se fixează într-un dispozitiv al microtomului fie singur, dacă acesta are o consistență corespunzătoare, fie cuprins între două bucăți de măduvă de soc, dacă materialul este moale sau piesa este de dimensiuni mici. Prin rotirea șurubului micrometric materialul este ridicat cu cîțiva microni deasupra

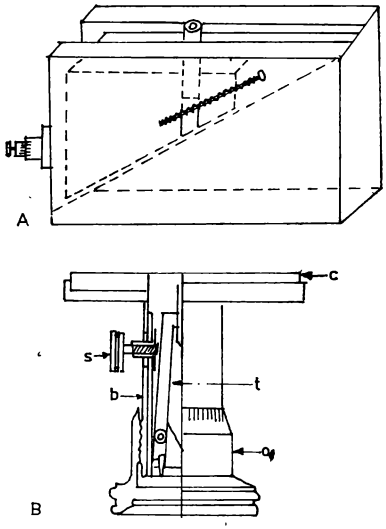


Fig. 64 — Două tipuri de microtoame de mînă: A — cu plan înclinat; B — cu avans prin deșurubare.

suprafeței de secționare. Briciul înclinat la 45°, tras prin glisare pe măsuța circulară sau șinele microtomului realizează secțiuni.

Operației de secționare trebuie să i se acorde cea mai mare atenție, știut fiind că de reușita acesteia depinde în mare măsură calitățile preparatelor. Dar, așa după cum remarca *Sass* (1951) — „instrucțiunile scrise au o mică valoare; principalele cerințe sînt răbdarea, experiența și, probabil, o îndemînare inerentă".

Clarificarea secțiunilor — Înainte de colorare multe dintre secțiunile histologice sînt supuse unei operații premergătoare cunoscută sub numele de clarificare. Clarificarea se poate realiza prin intermediul mai multor substanțe minerale și organice. dar dintre toate cel mai frecvent

utilizată este hipocloritul de sodiu sau potasiu (apa de javel). Peste secțiunile triate și reținute se toarnă hipoclorit de sodiu, în care se țin pînă cînd devin alb-lăptoase (1—10'). Pentru a evita distrugerea totală a celulelor, inclusiv a pereților celulari, se recomandă ca această operație să se facă sub control permanent la microscop. Javelul, fiind o soluție caustică, distruge conținutul viu al celulelor, punînd astfel mai clar în evidență peretii celulari.

Toluenul, xilenul, cloroformul și alți solvenți organici contribuie și ei la clarificarea secțiunilor.

Javelizarea este oprită la momentul oportun prin introducerea secțiunilor în apă. Spălarea secțiunilor și eliminarea bulelor de gaz formate se poate realiza prin transferul repetat al secțiunilor în mai multe vase cu apă acidulată (apă acetică 1%), urmată în final de o spălare abundentă în apă distilată.

Clarificate și hidratate secțiunile sînt supuse în continuare operației de colorare.

Colorarea — Pentru a scoate cît mai clar în evidență unele detalii structurale este indispensabilă colorarea diferențiată a materialului, fără de care unele cercetări histologice și în special citologice nu s-ar putea realiza. Colorarea diferențiată este posibilă datorită afinităților deosebite pe care diferitele elemente celulare (peretele, citoplasma, nucleul, vacuomul, ș.a.) o manifestă față de colorant; colorantul adecvat se fixează pe elementul față de care are afinitate cu atîta intensitate încît nu mai poate fi îndepărtat printr-o spălare obișnuită.

Se cunoaște un număr foarte mare de coloranți cito-histologici : cei mai uzuali sînt prezenți în alte pagini ale lucrării (v. pag. 136—155).

Metoda de colorare utilizată este dictată de scopul urmărit, iar în funcție de acesta se stabilesc : colorantul adecvat, timpul de acțiune al acestuia, temperatura, ș.a. Metodele de colorare pot fi grupate în mai multe categorii, în funcție de diverse criterii. Principalele tipuri sînt următoarele :

— *colorări difuze* — în care elementele structurale ale secțiunii apar uniform colorate ;

— *colorări selective* — în care fiecare țesut sau fiecare element structural celular se colorează diferit, permițînd astfel o analiză mai detaliată, mai complexă și mai precisă a materialului. La rîndul lor colorările selective pot fi *directe* — cînd secțiunile sînt trecute din apă direct în colorant — și indirecte — cînd secțiunile înainte de colorare sînt supuse unui tratament special, intermediar, care asigură o mai bună reușită a acesteia, cunoscută sub numele de mordansare sau baiț.

Mordansarea este indispensabilă în cazul în care colorantul utilizat nu poate reacționa direct cu elementele structurale celulare ; mordansarea are tocmai rolul de a facilita fixarea puternică a colorantului și de a-l face foarte rezistent la acțiunea substanțelor decolorante. Mordanții sînt atît substanțe organice cît și minerale. Dintre mordanții minerali cei mai uzitați citâm : alaunul de fier, alaunul de potasiu și mai rar alaunul de crom, acidul cromic, clorura de zinc sau de mercur ș.a. Dintre mordanții organici mai des folosiți sînt : acidul picric (care este

în acelaşi timp un bun fixator ca şi un bun diferenţiator) formolul şi acidul fenic.

Mordansarea are loc prin cufundarea secţiunilor în una din soluţiilor apoase ale substanţelor menţionate, timp de 30' — 24 de ore în funcţie de mordant şi colorantul folosit. Este urmată de o spălare în apă, după care se poate trece la colorare. Mordansarea se poate face şi concomitent cu colorarea prin amestecarea mordantului cu colorantul (într-o anumită proporţie), obţinîndu-se aşa numitul lac solubil.

În funcţie de concentraţia soluţiei colorante, colorarea poate fi progresivă şi regresivă.

Colorarea progresivă se realizează cu soluţii colorante diluate, în timp mai lung, pe cînd *colorarea regresivă* se face cu soluţii colorante mai concentrate şi într-un timp relativ scurt.

Întreruperea operaţiei de colorare se face în momentul în care elementele structurale ale preparatului sînt uniform şi puternic colorate şi se realizează prin înlocuirea colorantului cu apă (sau alcool). Nu trebuie să se ajungă la supracolorare deoarece se strică calitatea colorării. Dacă totuşi aceasta s-a întîmplat secţiunile sînt supuse operaţiei de decolorare, numită diferenţiere.

Diferenţierea constă în tratarea materialului cu o soluţie regresivă pentru eliminarea parţială a colorantului din celule sau ţesuturi. Unul dintre cei mai buni diferenţiatori este soluţia apoasă 1—2% de alaun feric, în special pentru hematoxilina ferică.

Diferenţierea se urmăreşte la microscop pentru a putea fi oprită la momentul oportun. Diferenţierea se realizează cu atît mai lent cu cît soluţia este mai diluată. Ea fiind progresivă (în cazul unei colorări cu hematoxilină ferică) se decolorează mai întîi citoplasma, apoi incluziunile şi în cele din urmă cromatina. Dacă diferenţierea s-a depăşit, colorarea se repetă după o rapidă spălare a secţiunilor în apă.

Colorările, privite în ansamblu, pot fi *simple* — cînd se utilizează un singur colorant, care dă o singură nuanţă de colorare — şi *combinate* — cînd se foloseşte un amestec de mai mulţi coloranţi, fiecare în parte evidenţiind numai unele elemnte structurale, secţiunile devenind policrome.

După o nouă spălare a secţiunilor colorate ele pot fi montate.

Montarea secţiunilor se poate face în una din substanţele menţionate la pag. 33—38. Alegerea uneia sau alteia dintre substanţele descrise nu poate fi întîmplătoare; ea trebuie să fie adecvată, în primul rînd, colorantului utilizat. Dacă mediul de montare este miscibil cu apa, secţiunile, imediat după spălare, fără nici un alt tratament, sînt montate. Dacă mediul de montare este balsamul de Canada, substanţă care nu este miscibilă cu apa, secţiunile vor fi mai întîi deshidratate şi apoi impregnate cu xilen (toluen ş.a.), operaţii ce se realizează prin trecerea secţiunilor prin seria de alcool şi prin mixtură de alcool-xilen pînă la xilen pur. În mijlocul lamei se pun, cu o baghetă de sticlă sau pipetă, 2—3 picături din mediul de montare. Cu o pensă fină se introduc în mediul de pe lamă una, două sau mai multe secţiuni (în funcţie de dimensiunile acestora), după care se aplică lamela. Uneori mediul de montare fiind în exces iese în afara lamelei, ceea ce este inestetic, iar lutarea nu mai poate fi realizată. Ca urmare excesul tre-

buic și poate fi îndepărtat prin absorbția sa cu micropipete, cu hîrtie de filtru sau prin ștergere cu tampoane de vată hidrofilă și cîrpe uscate.

Preparatele montate în medii care nu se solidifică pot fi lutate folosind procedeele descrise la pag. 35—36.

8.1. METODA INCLUDERII ÎN PARAFINĂ

Metodele moderne utilizate în cercetările de cito-histologie vegetală au incontestabil o importanță primordială, dar ele nu pot suplini metoda clasică a împarafinării, care își păstrează valabilitatea și importanța sa. Includerea în parafină este, așadar și azi o metodă curentă de laborator, utilizată, datorită rezultatelor sale remarcabile, atît în scopuri didactice-instructive cît și științifice. Constă în impregnarea totală și uniformă cu parafină a unui organism, organ, fragment de organ sau țesut, cu scopul de a le conferi o anumită consistență și elasticitate, proprietăți noi care vor permite secționarea lor la microtomul mecanic.

Metoda histologică a împarafinării cuprinde o serie de operații; unele sînt obligatorii, altele facultative în funcție de materialul prelucrat și scopul urmărit. În cazul cel mai complex succesiunea operațiilor este următoarea: *prefixarea, fixare, spălarea, deshidratarea* și *includerea în parafină, secționarea, întinderea și uscarea secțiunilor, deparafinarea, hidratarea, mordansarea, colorarea, montarea secțiunilor pe lame* (fig. 65).

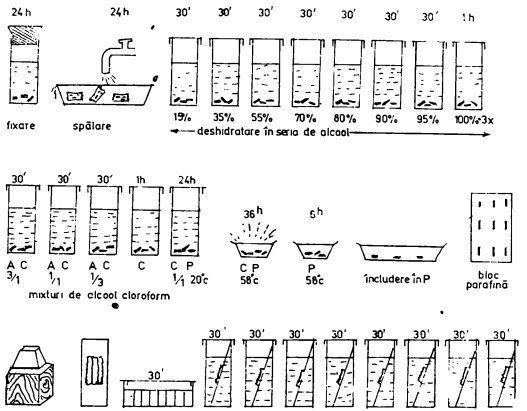
În cele ce urmează vom face o succintă prezentare, în ordinea firească, a fiecărei etape în parte, cu prezentarea unor modificări impuse de particularitățile materialelor biologice.

Pentru exemplificarea metodei redăm modul de lucru în cazul întocmirii preparatelor microscopice în care vom pune în evidență complementul cromozomial sau fazele diviziunii mitotice la unele specii de organisme.

Materialul adecvat: radicele tinere sau muguri vegetativi terminali. Radicelele se obțin în felul următor. Bulbii de ceapă maturi se așează deasupra unor borcane cu apă, sau în cristalizoare pe fundul cărora se găsește un strat format din 3—4 rondele de hîrtie de filtru îmbibate cu apă. Borcanele sau cristalizoarele se țin la temperatura laboratorului. După 2—3 zile din discul tulpinal se dezvoltă radicelele. Cînd acestea ating dimensiunea de circa 8—10 mm se vor recolta cu ajutorul unei forfecuțe. Excesul de apă de pe radicele de îndepărtează prin așezarea acestora pentru 1—2 minute pe o hîrtie de filtru, după care se introduc imediat în soluția fixatoare.

Radicelele unor graminee cerealiere (ex. grîul, secara, orzul, porumbul) și ale unor leguminoase (ex. bobul, mazărea, fasolea) sînt la fel de recomandate întrucît au cromozomii mari.

Cariopsele gramineelor sau semințele se pun la germinat în cutii Petri sterile, pe hîrtie de filtru umectată. Toate semințele menționate (mai puțin bobul) după cîteva zile (3—4 zile) germinează.



A

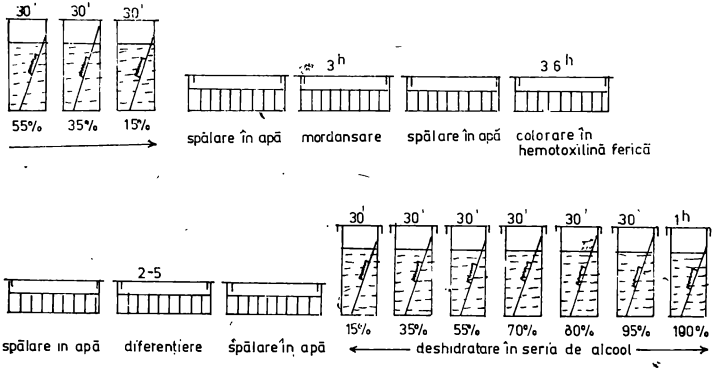
Fig. 65 — Etapele tehnicii includerii în parafină.

Recoltarea radicelelor este bine a se face în primele ore ale dimineții (7—9), perioadă cînd frecvența diviziunilor este maximă. Intensificarea procesului de diviziune poate fi indusă prin supunerea materialului la unele șocuri termice (30—60' în frigider la +5°C, apoi la temperatura laboratorului, 60—80') după care se face recoltarea radicelelor.

1. *Prefixarea* — operație obligatorie în cazul în care dorim să analizăm complementul cromozomal, avînd rolul de a inhiba formarea fusului de diviziune și de a determina o contractare (scurtare și îngroșare) a cromozomilor. Consecința, acumularea unui număr mare de metafaze, o mai pregnantă individualizare a cromozomilor care pot fi totodată mai ușor etalați (separați).

Ca substanțe prefixatoare mai adesea utilizate sînt : emulsia de α-bromonaftalenă, 0,1%, soluție apoasă 0,01% de colchicină și soluția apoasă 0,03% de hidroxichinolcină. Temperaturile joase de +1 și +2°C pot suplini cu bune rezultate substanțele menționate.

Durata prefixării depinde de substanța utilizată și de particularitățile materialului. De regulă, pentru radicele 2—3 ore sînt suficiente după care prefixatorul este înlocuit cu soluția fixatoare.



B

Fig. 65 — Etapele tehnicii includerii în parafină.

©RedAbaris 2013

În cazul în care dorim să evidențiem *fazele* diviziunii cariochinetice se renunță la prefixare, materialul trecîndu-se direct în fixator.

2. *Fixarea* — constă, după Lison (1960) în a consolida dispunerea spațială, labilă din celulele vii, determinînd legături între moleculele vecine, legături suficient de solide pentru ca ele să suporte manipulările impuse de tehnica histologică.

Consolidarea edificiului molecular celular se poate realiza cu ajutorul unei game largi de agenți chimici. Alegerea fixatorului nu poate fi întîmplătoare; ea este dictată de scopul urmărit și de metoda de colorare pe care urmează a o utiliza. Astfel pentru evidențierea materialului genetic cele mai bune rezultate se obțin cu următorii fixatori: Navașin, Carnoy, picroformolul Bouin, soluția cromo-osmică a lui Benda, lichidul cromoplatin a lui Merkel ș.a. (vezi pag. 108—135).

Durata fixării depinde de obiect, viteza de penetrație a fixatorului și temperatura la care se realizează.

Radicelele, în amestecul Navașin sînt corect fixate după 24 de ore, la temperatura laboratorului. După o fixare cu Navașin colorantul ideal pentru materialul genetic este hematoxilina ferică.

3. *Spălarea* — La momentul oportun acțiunea fixatorului este întreruptă printr-o spălare prelungită și repetată a materialului în apă curentă, alcool simplu sau iodat, în funcție de fixatorul utilizat. Spălarea are drept scop eliminarea totală a fixatorului din materialul biologic — ca urmare sistarea operației de fixare — și de a permite o mai bună colorare.

Radicelele fixate în amestecul Navașin vor fi spălate în apă curentă timp de 24 ore. Manipularea poate fi mult ușurată, iar riscul de a pierde materialul biologic înlăturat, dacă radicelele sînt introduse în tubușoare de sticlă legate la ambele capete cu cîte o bucată de tifon, sau în săculețe de tifon.

4. *Deshidratarea* — urmează spălării și se impune a fi realizată deoarece apa nu este miscibilă cu parafină și nici cu solvenții acesteia (xilen, toluen ,cloroform, benzen). Scoaterea apei din țesuturi se realizează prin trecerea materialului spălat printr-o serie succesivă de alcool cu concentrație crescîndă: 15%, 35%, 55%, 70%, 80%, 95%, 100%. În fiecare concentrație materialul se ține (30—60) minute. În alcool 70% materialul poate fi conservat. Pentru a avea garanția unei deshidratări perfecte alcoolul absolut (100%) se schimbă de trei ori la intervale de o oră.

Substituția alcoolului — Întrucît alcoolul nu este nici el miscibil cu parafina se va înlocui treptat cu unul din solvenții parafinei prin trecerea materialului (ex. a radicelelor) printr-o serie de mixturi alcool-cloroform (xilen sau toluen) în următoarele proporții: 3/1; 2/1; 1/2; 1/3; 1; 1; 1. În fiecare din mixturi materialul se ține pînă cînd radicelele cad pe fundul fiolelor (circa 30—60 minute), cloroformul schimbîndu-se de trei ori la intervale de o oră. În oricare din mixturi, ca și în cloroform pur, materialul poate fi ținut însă pînă la 24 ore, fără riscul de a se deteriora. Alcoolul, ca și cloroformul, fiind o substanță volatilă, fiolele vor fi ermetic închise cu dopuri de plută (sau cauciuc).

Cloroformul (xilenul, toluenul), ca solvent al parafinei, facilitează penetrația acestora în țesuturi, pe care le impregnează, conferindu-le consistența optimă secționării, realizînd totodată o clarificare a materialului biologic prin dizolvarea unor substanțe organice (ex. lipidele) și determină eliminarea aerului.

5. *Includerea în parafină* — are drept scop impregnarea materialelor biologice cu parafină și formarea blocuțelor. Prin urmare în cadrul acestei operații se disting două etape : impregnarea și montarea.

Pentru infiltrația parafinei în țesuturi se procedează astfel : într-o fiolă de sticlă se prepară o mixtură (1/1) de cloroform și parafină. Omogenatul poate fi realizat mai rapid dacă se va utiliza parafină topită. În această mixtură (cloroform-parafină, 1/1) se transferă, din cloroform ,materialele biologice (ex. radicelele) în care se țin circa 24 de ore la temperatura camerei. Pentru a evita evaporarea cloroformului este necesar ca fiolele să fie, și de astă dată, ermetic închise cu dopuri de plută sau de cauciuc. După scurgerea celor 24 de ore, fiolele, de la care s-au scos dopurile, se introduc în termostat la temperatura de 58—60°C, unde se lasă circa 2—3 ore, timp în care are loc evaporarea completă a cloroformului și infiltrația parafinei.

Pentru a avea garanția unei perfecte impregnări, materialul biologic se transferă în sticle de ceas (capsule de sticlă sau porțelan, cutii Petri, etc.) cu parafină pură al cărui punct de topire este în jur de 50—54°C în care se țin circa 1—3 ore în termostat la temperatura de 55—60°C.

În acest răstimp se pregătesc ustensilele și materialele necesare montării pieselor biologice în blocul de parafină : un vas cu parafină topită, glicerină, un cristalizor cu apă rece (cu ∅ de 16—18 cm), tăvițe de porțelan, lampa de spirt, lampa cu încandescență, ace spatulate, pensete ș.a.

Avînd la îndemînă toate aceste materiale și ustensile se poate trece la formarea blocuțelor paralelipipedice de parafină. Pentru realizarea acestora se procedează astfel : se introduce în priză platina șofantă, iar deasupra acesteia se plasează o lampă cu incandescență. În momentul în care platina s-a încălzit (60°C) se scot vasele cu material și cu parafină curată, lichefiată din etuvă și se așează pe platină. După ce vasele de împarafinare (= tăvițele de porțelan), au fost foarte bine unse pe toată suprafața internă cu glicerină pură și ușor încălzită, se toarnă în ele parafina lichidă pînă cînd grosimea acestuia este de circa 3—4 mm. Cu ajutorul unei pense cu vîrf subțire, încălzită la lampa de spirt, se scot piesele din vasul cu material și se ordonează (într-o poziție determinată și la distanțe egale) pe fundul tăviței de porțelan. Cînd această operație a fost încheiată, tăvița se ridică de pe platina șofantă, se așează pe un suport rece într-o poziție perfect orizontală, unde se lasă în repaos pînă cînd parafina începe să devină opacă, ceea ce indică începutul fenomenului de solidificare. Solidificarea trebuie grăbită pentru a împiedica formarea cristalelor care o face casantă. Grăbirea se realizează prin cufundarea tăviței într-un vas (cristalizator) cu apă rece. Pentru a evita formarea eventualelor goluri (bule) se apasă ușor cu degetul mare al mîinii libere pe suprafața parafinei. După circa 5—10 minute, vasul în care se află tăvița se așează sub un robinet din care curge un jet de apă

rece, unde se lasă pînă la completa solidificare a parafinei, moment marcat, de regulă, de ieşirea blocului de parafină din tăviţă.

Blocurile paralclipipedice de parafină, astfel obţinute, se şterg de picăturile de apă şi se etichetează. În cazul în care piesele incluse nu se disting prea clar, se indică pe bloc, prin trasarea unor săgeţi, locul şi direcţia axului lor longitudinal.

Blocurile care nu sînt imediat secţionate pot fi păstrate în cutii Petri, cutii de carton ş.a. la o temperatură nu mai mare de 25°C, deoarece peste această valoare termică, parafina începe să se înmoaie şi ca urmare blocul se deformează.

6. *Secţionarea materialului* — este operaţia ce urmează şi se realizează la microtomul mecanic (tip Minot, Reichert sau M.F.B.), procedînd în felul următor.

Din blocul mare de parafină, cu ajutorul unei lame de ras, a unui bisturiu bine ascuţit sau ac spatulat, se detaşează un mic bloculeţ, ce conţine o singură piesă biologică inclusă. Pe piesa port obiect a microtomului se va forma un „pat adeziv" de circa 2—4 mm. prin topiri şi solidificări repetate a aschiilor de parafină.

În centrul stratului de parafină astfel realizat pe port obiectul microtomului, se face o scobitură paralelipipedică (prin intermediul unui ac spatulat încălzit), lăcaş în care se introduce şi fixează blocul cu material. Pentru consolidarea bloculeţului pe port obiect, în jurul bazei sale se depun aşchii de parafină care se topesc succesiv.

Odată fixat şi consolidat bloculeţul trebuie fasonat, prin secţionarea laturilor sale dîndu-i în final o formă de prismă regulată sau de cub. Suprafaţa de secţionare ideală este cea dreptunghiulară sau pătratică ; oricum, pentru ca tenia să fie dreaptă se impune ca laturile opuse să fie egale şi paralele.

Orientarea bloculeţului se face în funcţie de direcţia de secţionare pe care dorim să o realizăm, transversală sau longitudinală.

Piesa port-obiect, pe care s-a lipit şi fasonat bloculeţul, se fixează în lăcaşul său din microtom, dîndu-i orientarea corespunzătoare (adică suprafaţa de secţionare să fie paralelă cu lama cuţitului).

Prin rotirea butonului de pe faţa frontală a microtomului se stabileşte grosimea secţiunilor (de la 5—30 μm).

Microtomul se deblochează, iar prin învîrtirea roţii angrenajele sale sînt puse în funcţiune. Dacă toate operaţiile au fost corect efectuate, cu fiecare coborîre a bloculeţului rezultă o secţiune. Secţiunile succesive se lipesc între ele formînd o bandă (panglică) de parafină cunoscută sub denumirea de tenie (fig. 66) (denumire inspirată de forma ei similară cu a acestui vierme). Se întîmplă ca secţiunile să nu se lipească între ele, sau banda să se fragmenteze. Aceasta înseamnă că parafina este prea rece şi ca urmare casantă. Neajunsul poate fi înlăturat prin plasarea deasupra piesei port-obiect a unei lămpi cu incandescenţă, care va facilita lipirea secţiunilor.

Cînd banda are o lungime de circa 15—20 cm secţionarea se opreşte, tenia se desprinde de pe lama cuţitului cu ajutorul unei pensule umectată în apă distilată şi se aşează pe o hîrtie neagră curată. Tot la fel se procedează pînă cînd va fi secţionat întregul material (fig. 66).

Întrucît în panglică secțiunile sînt depuse în ordinea succesiunii lor, există posibilitatea unui studiu comparativ referitor la aspectul diferitelor regiuni (zone), ale unui organ sau structuri oarecare.

7. *Montarea secțiunilor pe lamă.* Pe lama de sticlă, bine spălată,

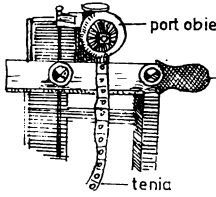


Fig. 66 — Aspectul teniei rezultată prin secționare la microtomul mecanic.

degresată și uscată în prealabil, se pune un strop de albumină-glicerinată-Mayer, care se întinde cu degetul într-un strat foarte subțire și uniform. (Albumina glicerinată are rolul de a lipi secțiunile pe lamă, permițînd manipularea ulterioară a acestora fără riscul de a le pierde sau deteriora).

Din panglica cu secțiuni se detașează segmente de circa 1,5 cm (—4 cm) și se așează tangent și paralel în mijlocul lamei pregătită în acest scop. Segmentele pot fi ordonate transversal sau longitudinal în funcție de modul de secționare al materialului avînd însă multă grijă ca lungimea acestora să nu depășească lățimea lamei sau a lamelei.

Lungimea segmentelor de tenie este aleasă în funcție de dimensiunile lamelelor pe care le vom utiliza la montarea preparatelor. Pentru a evita unele greșeli se recomandă ca înainte de a se trece la aranjarea și întinderea benzilor pe lamă, să se deseneze pe o coală de hîrtie sau de carton dimensiunile lamei și ale lamelei și să se traseze diagonalele lamei, intersecția lor indicîndu-ne punctul central al acesteia.

După ce lama se suprapune peste acest desen, se poate trece la aranjarea, întinderea și lipirea benzilor pe lamă (fig. 67 și 68). Pentru a

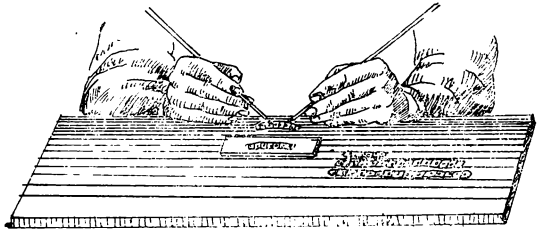


Fig. 67 — Ordonarea secțiunilor pe lamă pentru microscop.

facilita ordonarea benzilor și întinderea lor, se depun pe lamă 2—3 picături de apă. După ce secțiunile au fost bine întinse, lamele se pun pe platina șofantă unde se țin pînă cînd parafina devine translucidă (fig. 69). În acest timp albumina coagulează, realizînd o fixare puternică a secțiunilor pe lamă, iar parafina se înmoaie, realizîndu-se o mai bună întindere a benzilor. Fiecare lamă se numerotează (pentru a se ști ordinea secțiunilor), se așează în tăvițe și se introduc în termostat la temperatura

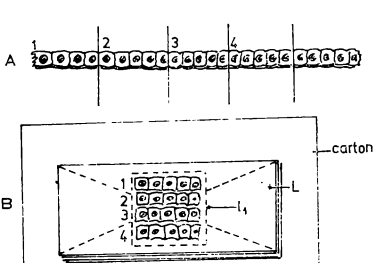


Fig. 68 — Aranjarea și întinderea fragmentelor de tenie pe lamă : A — fragment din tenia cu secțiuni ; B — ordonarea secțiunilor pe lamă utilizînd desenul de pe carton ; L — lamă de sticlă pentru microscop ; l — dimensiunea lamelei ; 1, 2, 3, 4 — fragmente de tenie cu secțiuni.

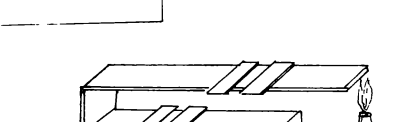


Fig. 69 — Placă șofantă pentru topirea parafinei din secțiuni.

de 35—37°C, unde se lasă 3—4 (—7) zile, timp în care are loc uscarea completă a secțiunilor.

8. *Deparafinarea secțiunilor*. Prelucrarea în continuare a secțiunilor necesită îndepărtarea parafinei, operație ce se realizează cu ajutorul acelorași solvenți organici (benzen, cloroform, toluen, xilen) al parafinei. Dacă dorim ca deparafinarea să fie grăbită, încălzim lamele cu material pe placa șofantă pînă cînd parafina se topește, după care se introduc în vasele Borell sau Laveran pline cu unul din solvenții organici ai parafinei. După circa două ore se transferă succesiv în alte vase cu solvenți (două), în fiecare ținîndu-se cîte o oră. În acest timp vasele se mișcă ușor pentru a crea un curent în solvent, ceea ce determină o mai rapidă și perfectă deparafinare.

9. *Hidratarea*. Deoarece majoritatea coloranților utilizați sînt soluții apoase sau alcoolice, este necesar ca secțiunile să fie hidratate. Hidra-

tarea nu poate fi făcută prin cufundarea lamelor cu secțiuni direct în apă, întrucît solvenții parafinei nu sînt miscibili cu apa. Pentru realizarea acestei operații secțiunile din xilen, sînt trecute mai întîi prin seria de xilen-alcool (3/1 : 2/1 : 1/1 ; 1 2 : 1 3 : 1 : 1), iar de aici (de la alcool absolut) mai departe prin seria de alcooli 95% ; 80% ; 70% ; 55% ; 35% : 15%), urmată de o spălare de 2—3 ori în apă distilată. În fiecare baie, lamele se țin 10—15′.

10. *Mordansarea* (baițul). Lamele cu secțiuni hidratate se trec în alte vase cu soluții apoase de alaun de fier 2,5% unde se lasă circa 3—5 ore. Prin impregnarea structurilor biologice cu această soluție, se facilitează colorarea. Mordansarea este întreruptă prin spălarea lamelor în apă distilată timp de 15—20′. Prin spălare se elimină excesul de soluție mordantă din țesut.

11. *Colorarea*. Pentru a scoate în evidență mai pregnant unele detalii structurale este indispensabilă colorarea materialului. Este posibilă realizarea unei colorații diferențiate datorită afinității deosebite pe care diferitele elemente structurale celulare o au față de colorant ; colorantul adecvat se fixează pe elementul față de care are afinitate cu atîta intensitate încît nu mai poate fi îndepărtat printr-o spălare obișnuită.

Principalii coloranți și metodele de colorare sînt prezentate într-un capitol anterior (v. pag. 136—155). Materialul genetic din celulele țesutului meristematic al radicelelor, după o fixare cu Navașin, vor fi colorate cu hematoxilină ferică *Heindenhain*. După mordansare și spălare lamele se imersionează în colorantul din vasele Laveran unde se lasă circa 2—5 ore, timp necesar colorării. Excesul de colorant din structurile biologice este spălat printr-o clătire a lamelor de 2—3 ori în apă distilată. Cu hematoxilină ferică se realizează, de regulă, o supracolorare ; ca urmare este necesară o diminuare a colorației, operație cunoscută sub numele de diferențiere.

12. *Diferențierea* constă în tratarea materialului cu o soluție regresivă, care are drept scop eliminarea parțială a colorantului de pe structurile pe care s-a fixat. Unul din cei mai buni diferențiatori pentru hematoxilină, este soluția apoasă 1—2% de alaun feric.

Lamele colorate și spălate se ordonează în cutii Petri cu soluție apoasă de 1—2% alaun feric. Diferențierea fiind progresivă în cazul unei colorări cu hematoxilină ferică Heindenhein, se decolorează mai întîi citoplasma apoi incluziunile și în final cromatina. Această operație se face sub control permanent la microscop pentru a fi oprită la momentul oportun, prin clătirea rapidă, de cîteva ori în apă. Dacă diferențierea s-a depășit, lamele se vor introduce din nou în colorant după o prealabilă spălare în apă, pentru reaccentuarea colorației pînă la intensitatea optimă. Odată cu controlul diferențierii se va face și controlul calității secțiunilor, reținîndu-se pentru montare numai cele corespunzătoare

13. *Deshidratarea și montarea*. Secțiunile reținute după triere vor fi montate în una din substanțele prezentate la pag. 33—38.

Alegerea unuia sau altuia din mediile de montare se face în funcție de colorantul utilizat. Montarea ideală este cea în balsam de Canada care asigură preparatelor o maximă stabilitate și durabilitate. Întrucît această rășină naturală nu este miscibilă cu apa, se impune deshidra-

tarea. Eliminarea apei din structurile biologice poate fi realizată prin trecerea lamelor cu secțiuni prin seria de alcool (15%; 35%; 55%; 70%; 85%; 95%; 100%). În fiecare concentrație lamele se țin 5—10 minute, alcoolul absolut schimbîndu-se de trei ori la interval de o oră. Alcoolul nu este nici el miscibil cu balsamul de Canada, de aceea trebuie înlocuit cu unul din solvenții acestei rășini (xilen, benzen, toluen). Pentru aceasta lamele sînt trecute succesiv printr-o serie de amestecuri alcool-xilen în următoarele proporții: 3/1; 2/1; 1/1; 1/2; 1/3; 1; 1; 1). Xilenul (benzenul sau toluenul) se schimbă de trei ori. Peste secțiunile de pe lamă, se pun una, două picături de balsam de Canada și se acoperă cu o lamelă curată și degresată. Preparatele întocmite nu pot fi analizate imediat deoarece balsamul fiind fluid riscăm să le deteriorăm. Pentru a evita deteriorarea preparatelor tăviţele se introduc în poziție perfect orizontală în termostat, la temperatura de 30—35°C, unde se țin circa 3—6 zile, timp în care are loc solidificarea balsamului.

Păstrarea în continuare a preparatelor se face în cutii speciale (fig. 70), ferite de praf care le alterează calitatea. După etichetare se intro-

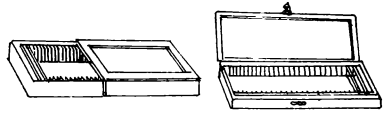


Fig. 70 — Cutii pentru colecții de preparate microscopice.

duc în colecția de preparate microscopice, constituind un excelent material didactic demonstrativ, la care se poate apela ori de cîte ori este nevoie, astfel de preparate avînd practic o durabilitate nedefinită.

9. TEHNICI DE INVESTIGARE A CELULELOR VEGETALE

În cercetarea universului celular sînt practicate azi tehnici de mare complexitate, rafinament și eficacitate care permit abordarea celor mai criptice fenomene vitale. Rezultatele biologiei celulare și moleculare din ultimele decade, unele de-a dreptul spectaculoase, justifică previziunile optimiste ale oamenilor de știință potrivit cărora biologia va cunoaște în curînd mutații calitative profunde — metodologice și conceptionale — devenind liderul științelor naturii.

Progresul în cunoașterea vieții este așadar strîns legat de această revoluție în tehnologia de investigare. Fără a nega valoarea cognitivă a tehnicilor moderne trebuie însă să recunoaștem că metodele și tehnicile clasice își mai păstrează încă valoarea lor formativă călăuzind pe mai tinerii cercetători pe unele căi deja „bătătorite", dar demne de parcurs.

Redăm în continuare cîteva tehnici simple dar eficiente, practicabile în orice laborator școlar, de evidențiere a unor constituenți celulari și de relevare a unor particularități fizico-chimice și fiziologice a acestora.

9.1. EVIDENȚIEREA PLASMALEMEI ȘI TONOPLASMEI

Plasmalema ca și tonoplasma sînt citomembrane cu grosimi de circa 8—10 cm, dimensiuni ce se situiază cu mult sub puterea de rezoluție a microscopului fotonic ; ca urmare ele nu pot fi vizionate decît la microscopul electronic. Prezența lor poate fi demonstrată prin plasmoliză, fenomen ce constă în desprinderea (parțială sau totală) a protoplastului de perete. Plasmoliza nu poate fi înțeleasă decît prin prisma permeabilității selective și dinamice a acestor citomembrane.

Materiale biologice : bulbi de *Allium cepa,* frunze de *Elodea canadensis.*

Intocmirea preparatului : se desprinde un fragment din epiderma superioară a frunzelor cărnoase ce intră în constituția bulbului de *Allium cepa* (o frunzuliță de *Elodea* sau un fragment din frunza de *Valisneria*) și se montează pe lamă într-o picătură de apă. Se analizează la microscop și se constată starea de turgescență a celulelor. Pe una din laturile lamelei se depun 2—3 picături de soluție concentrată de NaCl (1M de KNO_3 sau 5—7% de zaharoză), iar pe latura opusă o bucățică de hîrtie de filtru. Pe măsură ce apa este absorbită de hîrtia de filtru soluția salină

(sau de zaharoză) penetrează între lamă și lamelă, creînd un mediu hipertonic în jurul materialului biologic. În consecință apa din vacuolă trece în mediul extracelular (fenomen denumit exoosmoză), vacuola își micșorează treptat volumul, iar celula începe să se plasmolizeze. Plasmoliza începe la colțurile celulei și se extinde treptat, trecînd de la forma concavă (incipientă) la cea convexă (finală).

Fenomenul este reversibil dacă plasmoliza a fost indusă de o soluție fiziologică și n-a depășit un prag critic. *Deplasmoliza* se poate realiza prin înlocuirea treptată (ca mai sus, dar în sens invers) a mediului hipertonic cu apa.

Reversibilitatea fenomenului demonstrează că plasmoliza și deplasmoliza sînt nu numai procese fizico-chimice ci și fiziologice.

9.2. EVIDENȚIEREA VACUOLELOR

Vacuolele reprezintă adevărate lacuri în peisajul celulelor vegetale cu rol important în reglarea regimului hidric. Vacuolele reprezintă principalele compartimente celulare de depozitare nu numai a apei și a unor săruri minerale ci și a unei game largi de substanțe organice anabolice (substanțe de rezervă) sau catabolice (produși de excreție). Sucul vacuolar, delimitat de tonoplasmă (tonoplast), este o mixtură de soluții perfecte și coloidale. Mediul de dispersie este apa în care sînt solvite sau dispersate sub formă de micele o gamă largă de substanțe minerale (cloruri, ioduri, fosfați) și organice (acizi organici: malic, citric, oxalic; aminoacizi: asparagina, tirozina, leucina; hexoze: glucoza, fructoza, galactoza; gume, mucilagii, uleiuri eterice, alcaloizi, taninuri, cauciucuri ș.a.). În funcție de compoziția chimică calitativă și ponderea diferitelor substanțe pH-ul sucului vacuolar poate fi acid, neutru sau bazic.

Materiale biologice: bulbi de *Allium cepa,* frunze de *Elodea canadensis,* flori de *Rosa sp., Dianthus sp., Viola sp.*

Intocmirea preparatului — un fragment din epiderma superioară a frunzelor bulbului de ceapă (o frunză de *Elodea)* se imersionează pentru 10—15 minute într-o soluție apoasă 0,1% de roșu neutru, după care se spală în apă curentă și se montează pe lamă într-o picătură de apă. Colorantul se acumulează selectiv în vacuole pe care le colorează în roșu, facilitînd evidențierea lor la microscop. Aceeași culoare capătă și pereții celulari.

Petalele florilor de *Rosa, Dianthus, Viola* ș.a. constituie, de asemenea, materiale propice pentru studiul vacuomului; întrucît sucul vacuolar al celulelor constitutive este colorat nativ de antocianii solviți. Preparatele se obțin prin montarea unui fragment de petală într-o picătură de apă.

9.3. CURENȚII PLASMATICI

Matricea celulară (citosolul) reprezintă compartimentul cel mai frămîntat al celulei, cuprins de o permanentă mișcare frenetică cunoscută sub numele de *dinezâ.* Uneori aceste mișcări intracelulare au o mare

amplitudine (ceea ce a sugerat noțiunea de curenți plasmatici) determinînd deplasarea componenților citosolici și odată cu aceasta a tuturor organitelor celulare, unisens sau multisens. La baza genezei curenților plasmatici au fost puse multiple reacții metabolice care se desfășoară în diferite zone fiziologice ale matricei celulare. Elementele citoscheletului (microtubulii și microfilamentele) au neîndoielnic un rol important în geneza și ordonarea „curgerii" curenților.

Dineza poate fi observată în toate celulele vii, dar cu mult mai ușor, datorită amplitudinii sale particulare, în celulele plantelor acvatice (ex. ciuma apelor *(= Elodea canadensis)*, mărarul de baltă *(= Miriophylum spicatum)*, sîrmulița apelor *(= Valisneria spiralis)*, *Chara* sp. ș.a.), în hifele ficomicetelor (ex. mucegaiul apelor *(= Saprolegnia)*, în plasmodiile mixomicetelor (ex. *Physarum* sp.) și perii staminali (ex. sîrma de telegraf *(Tradescantia)*, peri absorbanți ș.a.

N. Kamiya clasifică mișcările citosolice în 7 tipuri dintre care cele mai spectaculoase sînt cele de rotație și circulație.

A. *Mișcarea de rotație* — este caracteristică celulelor cu o singură vacuolă centrală; „curgerea" citoplasmei se face ordonat într-un singur sens în cadrul aceleiași celule, cu o viteză de circa 3 mm/minut.

Materiale biologice — foarte nimerite sînt: frunze de *Elodea canadensis* și *Valisneria spiralis*, perișori absorbanți de *Hordeum vulgare* sau *Sinapis alba*, tal (zona internodală) de *Chara* sau *Nitella*, hife de *Saprolegnia* sau *Achlya* ș.a.

Întocmirea preparatului. În funcție de materialul biologic utilizat se adoptă unul din următoarele procedee:

a) se desprinde o frunzuliță din zona apicală a tulpinii de *Elodea canadensis* sau zona internodală a talului de *Chara (Nitela)* și se montează într-o picătură de apă.

b) se fac secțiuni tangențiale, mai groase, prin porțiunea bazală a frunzelor de *Valisneria spiralis* sau prin zona piliferă a rădăcinilor tinere de *Sinapis alba (Hordeum vulgare)*; una din secțiunile mai reușite se montează pe lamă într-o picătură de apă curată.

c) cu ansa, în prealabil flambată, se iau din vasele de cultură cîteva hife și se depun pe lamă într-o picătură de apă.

Preparatele se analizează la microscop imediat după montare deoarece, condițiile artificiale, improprii, vor altera în scurt timp funcțiile celulare, implicit dineza. Se observă o frumoasă mișcare pasivă a organitelor în manșonul plasmatic ce căptușește peretele celular, indusă de curenții plasmatici (fig. 71). Impresia generală creată în urma analizei unor astfel de preparate este de „curgere" a citoplasmei de-a lungul pereților celulari.

Mișcarea poate fi accelerată prin intensificarea fluxului luminos ce cade pe preparat sau prin montarea materialelor biologice într-un mediu (apă fiziologică) încălzit pînă la 30—40°C.

B. *Mișcarea de circulație* — este specifică celulelor cu mai multe vacuole; în cordoanele plasmatice ce interconexează punga plasmatică nucleară cu manșonul plasmatic perietal se pot observa curenți cu sensuri și viteze diferite.

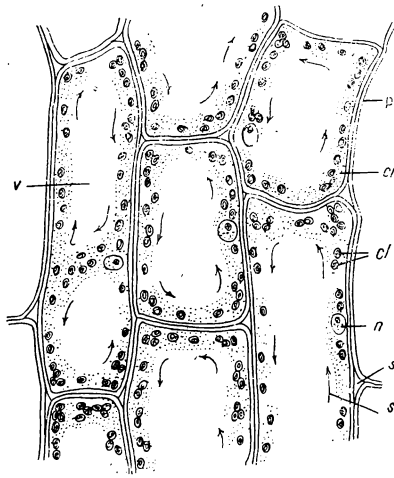


Fig. 71 — Rotația plasmei în celulele mezofilare de la *Elodea canadensis*: pc — perete celular; ci — citosol; cl — cloroplaste; n — nucleu; si — spațiu intercelular; sc — sensul curenților plasmatici; v — vacuole.

Materiale biologice adecvate sînt: flori proaspete de *Tradescantia virginica*, fragmente tulpinale cu frunze de *Bryonia dioica* și *Cucurbita pepo*, taluri de la diferite specii de alge verzi din ordinul *Conjugales* (ex. *Zygnema, Spyrogyra).*

Întocmirea preparatului. Cu o pensă fină se desprind de pe staminele florilor de *Tradescantia virginica* (sau de pe tulpina de *Bryonia* sau *Cucurbita)* cîțiva peri care se montează pe lamă într-o picătură de apă curată.

Analiza microscopică cu obiectivul mic (10 X) relevă structura pluricelulară uniserială a perilor; în fiecare celulă, de regulă dolioformă, se observă nucleul excentric, localizat într-o pungă plasmatică de la care pornesc în sens radiar, spre manșonul plasmatic parietal, mai multe cordoane plasmatice ce compartimentează vacuola centrală.

Cu un obiectiv mai mare (20x sau 40x) se poate observa o „curgere" rapidă a citoplasmei, adesea în sens contrar chiar în cadrul aceluiași cordon (Fig. 72).

Și de astă dată curenții plasmatici sînt evidențiați de deplasarea diferitelor organite (leucoplaste) și incluziuni ergastice prezente în citoplsmă.

Viteza curenților plasmatice poate fi măsurată prin utilizarea unui microscop cu grosismente cunoscute (calculate în prealabil) și a

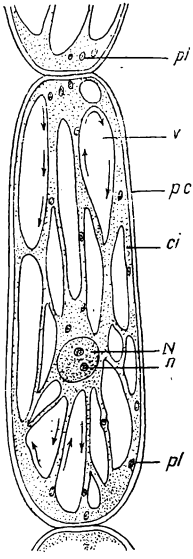


Fig. 72 — Circulația plasmei în celulele perilor staminali de la *Tradescantia virginica*: ci — citosol; N — nucleu; n — nucleol; pc — perete celular; pl — plastide (amiloplaste).

micrometrului ocular. În felul acesta poate fi urmărită și influența unor factori ecofiziologici (ca temperatura, lumina, sărurile minerale ș.a.) asupra dinezei.

9.4. EVIDENȚIEREA UNOR ORGANITE CELULARE

Celula eucariotă este amplu compartimentată de un sistem extensiv de endomembrane; fiecare compartiment reprezintă un organit în care se desfășoară în mod exclusiv sau preponderent anumite lanțuri metabolice celulare. Așadar celula este organizată pe principiul specializării funcționale și diviziunii muncii la nivel subcelular.

Din multitudinea de organite celulare numai mitocondriile și plastidele pot fi vizualizate la microscopul fotonic; cele mai multe (reticulul endoplasmic, corpii Golgi, lizozomii, peroxizomii, corpii paramurali ș.a.) nu pot fi rezoluționate decît de microscopul electronic.

9.4.1. MITOCONDRIILE

Mitocondriile sînt organite omniprezente în celulele eucariote oxibiote, îndeplinind multiple funcții, esențială fiind cea de fosforilare oxidativă de unde și definirea lor ca centrii respirației celulare. În realizarea reacțiilor oxidative un rol determinant îl au lanțurile respiratorii din membranele mitocondriale care asigură transferul electronilor și a protonilor de H^+ pînă la oxigen care constituie acceptorul final, rezultînd apa metabolică. Energia rezultată este stocată prin fosforilarea ADP, rezultînd ATP.

Mitocondriile au o refringență scăzută, numai cu puțin mai mare decît a matrixului plasmatic, fapt ce face dificilă observarea lor „in vivo" la microscopul fotonic obișnuit. Decelarea lor este posibilă la microscopul cu contrast de fază și cu fond (cîmp) întunecat și mai ales după o prelucrare citochimică în care sînt utilizați coloranți vitali (ex verde de Janus, violet de Dahlia, sărurile de tetrazolium) sau histologici specifici (sulfat de berberină, bicromatul de potasiu, hematoxilina, soluția Lugol).

În mod curent, pentru evidențierea mitocondriilor ca și a potențialului lor oxidoreducător se folosește verdele de Janus. Acest colorant vital oxidat, de culoare verde-albăstruie, la nivelul mitocondriei este redus (acceptă electroni) de la flavoenzime și se transformă într-un derivat leuco. Foarte rapid este reoxidat de citocromii a, a_3, c și c_1 și deci recolorat. După viteza de recolorare se poate aprecia potențialul oxidoreducător al organitului.

Activtatea dehidrogenazelor poate fi evidențiată prin utilizarea sărurilor de tetrazolium. Clorura de trifeniltetrazolium la nivelul mitocondriei se reduce și se transformă în formazan, substanță de culoare roșie, care evidențiază organitul. Rezultatele pot fi interpretate și cantitativ prin măsurarea intensității culorii la citofotometru sau prin extragerea și dozarea formazanului format.

Mitocondriile pot fi evidențiate satisfăcător și prin colorare cu bicromat de potasiu, hematoxilină ferică și soluția Lugol.

Materiale biologice recomandate: frunze tinere de *Elodea canadensis*, epiderma superioară a frunzelor bulbului de ceapă, vîrfuri vegetative tulpinale sau radiculare, hife de *Saprolegniaceae* ș.a.

Intocmirea preparatului

a) Din culturile sterile de *Saprolegniaceae* se desprind cu ansa flambată cîteva hife și se depun pe lamă într-o picătură de verde de Janus. După circa 2—3 minute, materialul este bine colorat și poate fi analizat la microscop. În manșonul plasmatic ce căptușește peretele celular se pot observa numeroase formațiuni granulare, baciliforme sau filamentoase contorsionate, colorate în verde, antrenate într-o frenetică mișcare de curenți plasmatici.

b) Cu pensa se desprinde un fragment din epiderma superioară a frunzelor bulbului de ceapă sau o frunzuliță tînără din apexul tulpinii de *Elodea canadensis* și se montează pe lamă în una-două picături de verde de Janus, sau IIK.1%. Imaginea microscopică este similară cu cea anterioară, cu singura deosebire că în cazul utilizării soluției Logol, mitocondriile apar colorate în galben-portocaliu.

c) Mitocondriile pot fi observate, de asemenea, în celulele meristemelor apicale, urmînd tehnica includerii în parafină (vezi pag. 162), fixarea realizîndu-se cu bicromat de potasiu timp de 24 de ore, iar colorarea cu hematoxilină ferică Haidenheim. În astfel de preparate mitocondriile apar colorate într-un violaceu închis.

9.4.2. PLASTIDELE

Plastidele sînt organite celulare caracteristice lumii vegetale, divers colorate (cloroplastele şi cromoplastele) în funcţie de natura pigmenţilor pe care-i conţin şi a raportului lor cantitativ, sau incolore (proplastide, etioplaşte, leucoplaste), polimorfe.

Urmărindu-se evoluţia plastidelor în cadrul dezvoltării ontogenetice a plantelor superioare şi în raport cu condiţiile ecofiziologice ale mediului ambiant se poate afirma că de fapt există un singur tip plastidial care se prezintă sub diferite aspecte. Deci, din punct de vedere genetic, variatele tipuri de plastide sînt omoloage şi se pot transforma unele în altele.

Celula dispune de un sistem homeostazic extrem de eficient care asigură transmiterea plastidelor de-a lungul generaţiilor celulare, menţinerea relativ constantă a volumului şi a numărului de plastide per celulă.

Întrucît în cadrul unei celule condiţiile genetice şi ecofiziologice sînt egale în toate sectoarele sale populaţia plastidială este de regulă uniformă. Există şi rare excepţii de heterogenitate plastidială; un exemplu în acest sens îl constituie unele alge sifonale (ex. *Caulerpa)* care conţin amiloplaste în endoplasmă şi cloroplaste în ectoplasmă.

9.4.2.1. Cloroplastele

Din complementul plastidial al lumii vegetale se detaşează prin diversitate şi importanţă cloroplastele. Sub această denumire sînt cunoscute plastidele care conţin pigmenţi clorofilieni şi în consecinţă au potenţialitate fotosintetică.

Forma, dimensiunea, structura şi numărul cloroplastelor per celulă sînt relativ labile şi foarte variate, adesea specie specifice, ceea ce permite utilizarea lor în investigaţii taxonomice.

În evoluţia plantelor se remarcă o reducere treptată a mărimii cloroplastelor paralel cu creşterea numărului lor per celulă şi o stabilitate accentuată a formei şi structurii acestor organite.

Polimorfismul cloroplastelor ca şi sensul evoluţiei lor pot fi ilustrate şi argumentate prin analiza acestora de la variate grupe taxonomice de talofite şi cormofite. Recomandate în acest sens sînt speciile cuprinse în tabelul nr. 13.

Cloroplastele fiind colorate se observă uşor în preparate proaspete, nefiind necesare tratamente speciale.

Întocmirea preparatului: Preparatele cu alge unicelulare se realizează în felul următor. Cu o pipetă (instilator) se absoarbe din cultură sau din vasul cu material conservat o anumită cantitate de lichid, din care una sau două picături se depun pe lama pentru microscop peste care se aplică lamela.

Taxonul	Nr. cloroplaste/celulă	Forma cloroplastelor	Nr. pirenoizilor/cloroplast	Se folosește
Chlorohyta	cromatofori verzi ; pigmenții clorofilieni sînt dominanți			
Chlamydomonas	1	cupă	1	indivizi (celule)
Ulothrix	1	cilindru incomplet	1—5	fragmente de tal
Draparnaldia	1	panglică lobată	2—4	fragmente de tal
Oedogonium	1	reticulat	numeroși	fragmente de tal
Closterium	2	masiv cu creste (falduri)	numeroși	indivizi
Mougeotia	1	placă (lamă)	numeroși	fragmente de tal
Zygnema	2	stelată	1	fragmente de tal
Spirogyra	1—6	panglică-lobată cu dispoziție spiralată	numeroși	fragmente de tal
Cladophora	1	reticulat	numeroși	fragmente de tal
Chara	numeros	lenticulară	—	fragmente de tal
Nitela	numeros	lenticulară	—	fragmente de tal
Phaeophyta	feoplaști ; dominant este pigmentul carotenoid			fucoxantina
Cystoseira	numeros	lenticulare	1	secțiuni prin tal
Bacillaryophyta	feoplaști ; pigmenții dominanți : și diatomoxantina		diadinoxantina	
Pinnularia	2	placă (bandă)	2—4	indivizi
Rhodophyta	rodoplaști ; pigmenții dominanți ; ficoeritrina, foarte rar și ficocianina			
Ceramium	numeros	lenticulară	—	fragmente de tal
Dassya	numeros	lenticulară	—	fragmente de tal
Bryophyta				
Minium	numeros	lenticulare	—	frunzuliță
Pteridophyta				
Selaginella	numeros	variabilă	—	frunzuliță
Gymnospermae	numeros	discoidale		
Abies (Picea, Pinus)	numeros	discoidale	—	secțiuni prin frunze
Angiospermae	numeros	discoidale		
Elodea	numeros	discoidale	—	frunzuliță
Valisneria	numeros	discoidale	—	fragmente de frunză
Tradescantia	numeros	discoidale	—	secțiuni prin frunză sau epidermă inferioară

În cazul formelor pluricelulare filamentele algale se taie în fragmente de circa 1 cm. Cu pensa se iau cîteva fragmente de tal și se depun pe lamă într-o picătură de apă. Cu ajutorul a două ace spatulate segmentele taline se separă cît mai bine, evitîndu-se pe cît posibil suprapunerile. Peste material se așează lamela, evitînd formarea bulelor de aer, și astfel preparatul este finit.

Cînd se folosesc frunze, fragmente de frunze, epiderme sau secțiuni, acestea se montează, de asemenea, pe lamă într-o picătură de apă.

Analiza microscopică se face într-o primă etapă cu obiectivul mic (10 x), iar detaliile pot fi reliefate cu un obiectiv cu putere de rezoluție superioară (20 x, 40 x, sau 90 x) (Fig. 71, 73, 74).

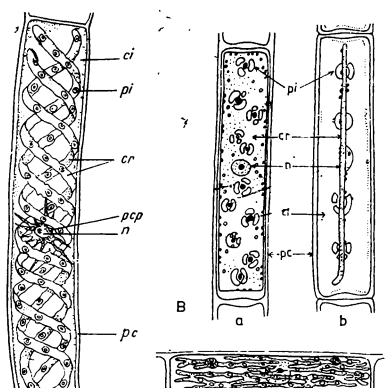


Fig. 73 — Morfologia cromatoforilor de la unele specii de alge verzi : A — *Spyrogira sp.* ; B — *Mougeotia sp.* : — vedere din față : (a) și din profil (b) ; c — *Oedogonium sp.* : ci — citosol ; cr — cromatofor ; n — nucleu ; pc — perete celular ; pcp — punță citoplasmatică ; pi — pirenoid.

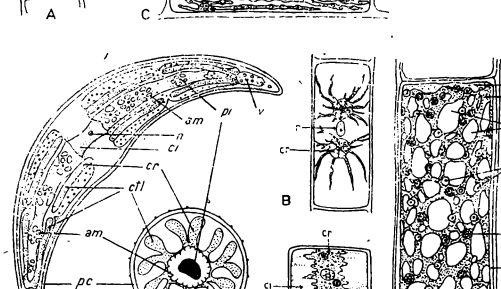


Fig. 74 — Tipuri morfologice de cromatofori de la unele alge verzi : A — *Closterium* în vederea tangențială (a) și în secțiune transversală (b) B — *Zygnema* ; C — *Draparnaldia* ; D — *Cladophora* : **am** — **amidon** ; **ci** — citosol ; cr — cromatofor ; crl — creste longitudinale ale cromatoforului ; n — nucleu ; pc — perete celular ; per — perforații ale cromatoforului ; pi — pirenoid ; v — vacuole terminale cu cristale de sulfat de calciu.

9.4.2.2. Cromoplastele

Cromoplastele sînt plastide colorate în galben-portocaliu sau roșu, care conțin în exclusivitate pigmenți carotenoizi (carotine și xantofile); sînt fotosintetic inactive dar au importanță ecologică (în polenizare și diseminarea semințelor și fructelor, ca atractanți animali).

Cromoplastele adevărate au apărut în strînsă conexiune cu evoluția florilor și fructelor avînd un rol important în filogeneza angiospermelor.

Sînt prezente de regulă în petale, stamine, pericarpul fructelor cărnoase, mature, tegumentul seminal și mai rar în organele vegetative (ex. rădăcinile tuberizate de *Daucus carota*, frunzele persistente de *Evonymus japonica*), dîndu-le o coloratie caracteristică.

Cromoplastele sînt polimorfe, forma, dimensiunea și structura lor variază de la o specie la alta, iar uneori chiar în cadrul aceluiași individ în funcție de organ, calitatea unor factori ecofiziologici ceea ce sugerează că factorii epigenetici pot juca un rol important în diferențierea acestor organite.

Cromoplastele pot fi evidențiate într-o gamă largă de materiale biologice; recomandate sînt și cele înserate în tabelul nr. 14.

Tabelul 14

Taxonul	Organul utilizat	Tip morfologic de cromoplaste
Daucus carota	rădăcini tuberizate	cristaloid; aciculare prismatice, piramidale
Lycopersicum aesculentum	fructe mature	globulare, sferice sau ovale, cristaloide prismatice
Lycium halepense	fructe mature	globular; ovoidale
Capsicum annuum	fructe mature	tubulos: ovoidale sau lenticulare
Rosa canina	fructele false, (pseudobace) mature	globulare-eliptice pînă la fusiforme
Tropaeolum europaeum	petale	tubulos: lenticulare
Cucurbita pepo	petale	tubulos: sferice
Cucurbita maxima var. turbaniformis	fructe mature	membranos: sferice
Narcisus pseudonarcisus	petale	membranos: ovoidale
Evonymus japonica	frunze	globulos

Cromoplastele fiind colorate se evidențiază ușor în preparate proaspete. Morfologia și topografia cloroplastelor sînt ilustrate în fig. 75—77.

Intocmirea preparatului. Se fac secțiuni fine (cu briciul anatomic sau cu o lamă de ras) care se montează pe lamă într-o picătură de apă. Fragmentul de țesut se agită insistent (cu acul sau pensa) în picătură de apă pentru a izola cît mai multe celule după care se acoperă cu lamela.

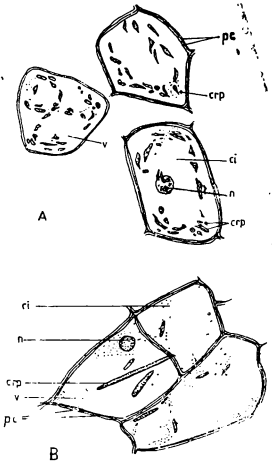


Fig. 75 — Cromoplaste în celulele mezocarpului de *Rosa sp.* (A) și în cele ale parenchimului cortical radicular de *Daucus carota* (B) : ci — citosol ; crp — cromoplaste ; n — nucleu ; pc — perete celular ; v — vacuole.

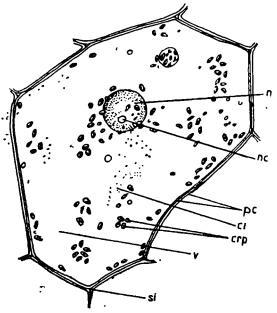


Fig. 76 — Cromoplaste într-o celulă a mezocarpului fructului de *Lycopersicum aesculentum* : ci — citosol ; crp — cromoplaste ; n — nucleu ; nc — nucleol ; pc — perete celular ; si — spațiu intercelular.

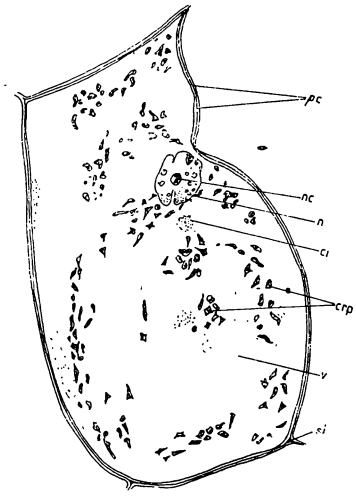


Fig. 77 — Cromoplaste într-o celulă a mezocarpului fructului de *Capsicum annuum* — cl — citosol ; crp — cromoplaste ; n — nucleu ; nc — nucleol ; pc — perete celular ; si — spațiu intercelular ; v — vacuola.

Analiza microscopică va releva de fiecare dată prezența în celulele parenchimatice (radiculare, mezofilare, mezocarpice) frumoase cromoplaste galbene, portocalii sau roșii.

9.4.2.3. Leucoplastele

Leucoplastele sînt plastide incolore prezente în celulele parenchimurilor de depozitare, țesuturile meristematice și epidermale. Au fost evidențiate, de asemenea, în celulele sporale și în gameții feminini ai plantelor superioare.

Leucoplastele au rol în sinteza și depozitarea substanțelor de rezervă. În funcție de natura chimică a substanței acumulate au fost clasificate în *amiloplaste, oleioplaste* și *proteinoplaste*.

Datorită indicelui lor de refracție, superior hialoplasmei, leucoplastele pot fi observate relativ ușor în preparate proaspete. Preparatul cîștigă în contract și claritate dacă sînt utilizați coloranți vitali (ex : verde de Janus, violet de Dahlia, metil-violet) sau nevitali (ex. soluția Lugol, Sudan III).

În imaginile fotonice au aspectul unor corpușoare sferice sau ovale (mai rar baciliforme), cu diametrul de 1—4 μm.

Materiale biologice recomandate : frunze de *Tradescantia* și rizomi de *Iris germanica* pentru amiloplaste, semințe de *Juglans regia* sau frunze de *Colchicum* pentru oleioplaste.

Întocmirea preparatului. Pentru evidențierea amiloplastelor la *Tradescantia* se detașează cu pensa, acul spatulat sau cu o lamă de ras un fragment din epiderma inferioară a frunzei și se montează pe lamă într-o picătură de apă. Amiloplastele la *Iris germanica* pot fi observate în secțiuni fine longitudinale prin zona corticală a rizomului, montate în IIK 1%.

Analiza microscopică relevă în primul caz prezența în jurul nucleului celulelor anexe ale aparatului stomatic numeroase amiloplaste sferice, refringente (fig. 78). Tot un aspect globulos au și amiloplastele din

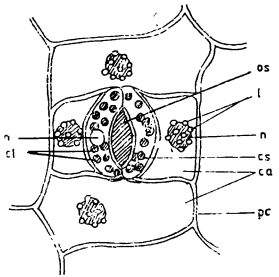


Fig. 78 — Organizarea aparatului stomatic de la *Zebrina pendula*. În jurul nucleilor celulelor anexe se observă numeroase leucoplaste sferice : ca — celulă anexă ; cs — celulă stomatică ; n — nucleu ; os — ostiol ; pc — perete celular.

celulele parenchimatice, alungit-poligonale ale rizomului de *Iris*. La o analiză atentă se poate observa în plus prezența în fiecare amiloplast a unui granul de amidon (sau două) colorat în albastru intens.

Tot un fragment de epidermă foliară, dar de astă dată superioară, se folosește și în cazul în care dorim să evidențiem oleioplastele. Fragmentul de epidermă se montează în Sudan III ; oleioplastele baciliforme apar colorate în roșu-portocaliu.

9.5. TEHNICI DE EVIDENȚIERE A INCLUZIUNILOR ERGASTICE

Incluziunile ergastice sînt depozite de substanțe solide, lichide sau gazoase, prezente în diverse compartimente celulare. Cînd sînt produse anabolice reprezintă substanțe de rezervă ce vor fi reciclate în anumite faze fenologice. Pot fi însă și rezultatul final al unor lanțuri catabolice și în acest caz sînt considerate ca substanțe de excreție.

În cadrul regnului vegetal există o gamă largă de incluziuni ergastice ; vom menționa în cele ce urmează numai pe cele mai frecvente și mai facil de evidențiat.

9.5.1. AMIDONUL

În celulele plantelor se găsesc mai multe tipuri de amidon : de asimilație (primar), tranzitoriu și ocrotit (de rezervă).

Amidonul de asimilație (primar), numit și autohton sau plastidial, se formează în procesul de fotosinteză în cloroplaste. Pentru evidențierea acestui tip de amidon recomandate sînt frunzele de *Elodea canadensis, Valisneria spiralis, Iris germanica* și *Beta vulgaris.*

Întocmirea preparatului. Materialul se recoltează după circa două ore de la răsăritul soarelui. O frunzuliță de *Elodea* sau un fragment de frunză de *Valisneria* se montează pe lamă într-o picătură de soluție apoasă 0,5% de IIK. În cazul utilizării frunzelor de *Beta* sau *Iris,* se fac secțiuni fine sau se jupoaie un mic fragment din epiderma inferioară [1] care se montează în aceeași soluție. După circa 2—3 minute materialul este optim colorat ; în fiecare cloroplastă poate fi observat cel puțin un granul de amidon colorat în albastru sau mov.

Foarte bune rezultate se obțin și prin colorare cu soluția apoasă de cloral-iodat.

Amidonul secundar — se prezintă, de asemenea, sub formă de granule ce se formează în amiloplastele celulelor organelor de depozitare. În jurul hilului, centrul de geneză a viitorului granul se depun straturi succesive, egale sau inegale de amidon care vor determina o creștere în volum progresivă a granulului. În final granulul va ocupa întreg spațiul plastidial. Dacă într-un amiloplast apare o singură veziculă amilogenă (un singur hil), în acesta se formează un singur granul de amidon, care este denumit *simplu.* La unele specii de plante (ex. *Avena sativa, Oryza sativa* ș.a.) într-un leucoplast apar simultan mai multe vezicule ; ca urmare în aceeași plastidă se vor forma simultan mai multe granule de amidon, denumite *parțiale,* iar toate la un loc constituie un granul *compus.* Există și o a treia posibilitate în sensul ca într-un leucoplast să apară mai multe vezicule amilogene care ulterior vor fuziona generînd doar cîteva hiluri (mai adesea 2—3) ; cele cîteva granule de amidon vor forma împreună un granul *semicompus.*

Așadar, însușirile morfologice ale granulelor de amidon sînt specie-specifice (fig. 79, 80).

Materiale biologice recomandate : cariopse de graminee cerealiere (ex. porumb, grîu, orez, ovăz, orz), semințe de fasole, tuberculi de cartof.

Întocmirea preparatului : cariopsele, semințele ca și tuberculii de cartof se secționează, iar de pe suprafața secțiunii se rade ușor o mică cantitate de material care se depune pe lamă într-o picătură de apă la care se adaugă o foarte mică cantitate (atît cît se ia pe vîrful acului spatulat) de soluție Lugol (I + IK). După acoperirea materialului imersionat cu o lamelă, excesul de colorant este absorbit cu ajutorul unei hîrtii de filtru.

[1] Preparatele cu fragmente de epidemă pot fi utilizate și în alte scopuri și anume : stabilirea caracterelor morfo-anatomice ale stomatelor, demonstrarea închiderii și deschiderii stomatelor, stabilirea gradului de ploidie al plantelor analizate.

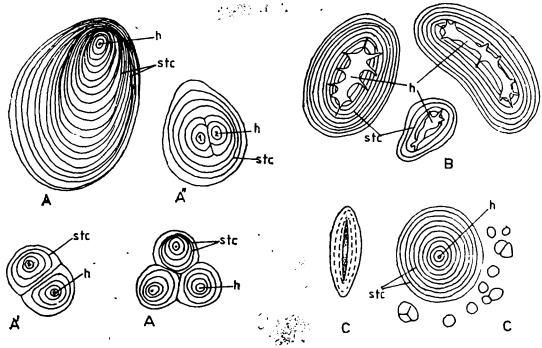


Fig. 79. Granule de amidon simplu : A — *Solanum tuberosum* ; B — *Phaseolus vulgaris* ; C — *Triticum vulgare* : A' și A'' — granule de amidon semicompuse la *Solanum tuberosum* : h — hil ; stc — striuri de creștere.

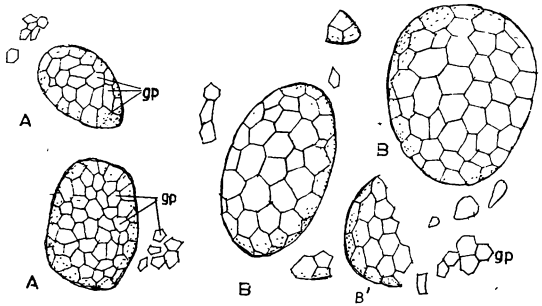


Fig. 80 — Granule de amidon compus — A — *Oryza sativa* ; B — *Avena sativa* ; B' — fragment dintr-un granul compus ; gp — granule parțiale.

9.5.2. INULINA

Inulina — este un polimer al D-fructozei care substituie amidonul la unele grupe taxonomixe de angiosperme (ex. familia *Compositae* și unele specii de gentianacee). Inulina este o incluziune lichidă

ce apare în vacuole sub formă de picături. În prezența alcoolului etilic absolut sau a glicerolului precipită sub formă de sferocristale (fig. 81).

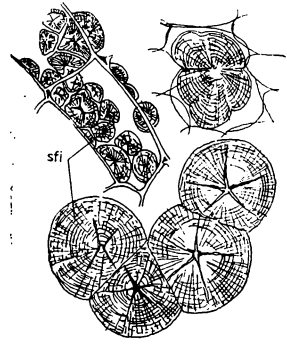


Fig. 81 — Sferocristale de inulină (sfi) în celulele parenchimului radicular de *Dahlya variabilis*.

Material biologic: rădăcini tuberizate de *Dahlya variabilis* care se recoltează în perioada de deplină maturitate fiziologică. Imediat după recoltare materialul se conservă în alcool etilic 80%.

Întocmirea preparatului. Se fac secțiuni fine prin rădăcini conservate sau ținute cel puțin o oră în alcool etilic 80%. Una din secțiunile mai fine se montează pe lamă într-o picătură de apă și se analizează la microscop.

9.5.3. LIPIDELE

Lipidele — reprezintă o altă incluziune ergastică cu largă răspîndire, depozitate în celule sub formă de picături. Abundă în endospermul semințelor oleaginoase.

Materiale biologice: semințe de *Juglans regia, Cucurbita pepo, Helianthemum annuum, Linum usitatissimum* ș.a.

Întocmirea preparatelor — Se fac secțiuni fine prin cotiledoanele embrionului. Secțiunile reușite se pun într-o sticlă de ceas peste care se toarnă Sudan III. După circa 5 minute, timp necesar colorării, 1—2 secțiuni se montează fie pe lamă într-o picătură de apă sau de gelatină glicerinată dacă dorim să le păstrăm în colecție. Analiza microscopică relevă prezența în celulele poligonale ale parenchimului de depozitare, a picăturilor de lipide colorate în roșu, ca și a unor granule incolore de aleuronă.

9.5.4. ALEURONA

Aleurona — reprezintă o substanță de rezervă de natură proteică prezentă în celulele endospermului de la multe specii de plante. Se prezintă sub forma unor corpușoare sferice sau poligonale delimitate

de o membrană simplă. Matricea fin granulată înglobează, de regulă, un corp proteic cunoscut sub numele de cristaloid şi unul sau mai multe formaţiuni sferice numite globoizi a căror compoziţie chimică este numai în parte cunoscută ; se pare că sînt formaţi din săruri de Ca şi Mg ale acidului inositohexafosforic.

Prezenţa membranei delimitante, ca şi conţinutul bogat în enzime hidrolazice (îndeosebi proteaze şi fosfataze), a condus la încadrarea lor în sistemul lizozomal.

Corpurile proteice se formează prin compartimentarea sistemului vacuolar al celulei pe măsura acumulării proteinelor de rezervă în matrixul vacuolar.

Materiale biologice : seminţe mature de *Ricinus communis.*

Întocmirea preparatului : Se îndepărtează tegumentul seminal (mai întîi testa tare şi apoi tegmenul membranos arahnoideu) şi se rade cît mai fin cu acul spatulat sau o lamă o mică cantitate de ţesut endospermal. Materialul obţinut se depune pe lamă într-o picătură de acid picric. După circa 2—3 minute acidul picric se îndepărtează prin absorbţie cu ajutorul unei hîrtii de filtru, iar peste material se adaugă eosină. Eosina colorează cristaloidul proteic în roşu facilitînd evidenţierea acestuia.

În cazul în care nu dispunem de acid picric şi eosină materialul obţinut prin radere poate fi montat în ulei de vaselină sau glicerină anhidră, imaginile fiind şi în acest caz edificatoare.

Pentru a observa topografia granulelor de aleuronă în spaţiul celular sînt necesare secţiuni fine executate prin cotiledoane. Secţiunile reuşite se ţin în alcool 90% timp de 1—2 ore (care se schimbă de 2—3 ori) după care se tratează cu o soluţie alcoolică 1% de acid picric. După 5—10 minute soluţia alcoolică de acid picric se îndepărtează, secţiunile se spală în alcool etilic şi se colorează cu eosină. După 10 minute secţiunile se spală din nou cu alcool, se montează în glicerină-alcoolică sau glicerină iodată şi se analizează la microscop (fig. 82).

Un alt mod de preparare constă în fixarea secţiunilor în formol şi colorarea lor cu albastru de toluidină. În prezenţa acestui colorant diversele componente ale granulului de aleuronă se colorează astfel : matricea în albastru, cristaloidul în albastru intens, iar globoidul în roşu.

Ca mediu de montare mai poate fi utilizată, cu bune rezultate, glicerina-iodată, care colorează matricea şi cristaloizii în brun, în timp ce globoizii rămîn incolori.

9.5.5. CRISTALE DE OXALAT DE CALCIU

Cristalele de oxalat de calciu — reprezintă incluziuni ergastice solide, produse ale catabolismului celular, întrutotul caracteristice lumii plantelor. Ele se formează de regulă în vacuole, rareori şi în alte compartimente celulare. Cristalele rezultate prin cristalizare monoclinală sau tetragonală sînt incolore, insolubile în apă şi acid acetic, solubile în acid clorhidric diluat.

Forma şi dimensiunea cristalelor de oxalat de calciu sînt foarte variate, caracteristice diferitelor specii, organe sau ţesuturi vegetale,

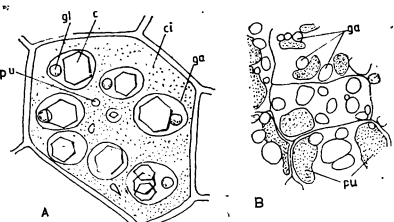


Fig. 82 — Granule de aleuronă din celulele cotiledonare de *Ricinus communis* (A) și *Juglans regia* (B) : c — cristaloid ; ci — citosol ; ga — granul de aleuronă ; gl — globoid ; pu — picătură de ulei.

constituind uneori criterii taxonomice valoroase. Cele mai comune forme de cristale sînt următoarele : cristale minuscule, polimorfe, numite nisip cristalin de oxalat de calciu, cristale aciculare, romboiedrice, octoedrice, prismatice. Aceste cristale pot fi izolate, asociate în mănunchiuri numite *rafide* sau concrescute numite *macle, druze* sau *ursini*.

Materiale biologice — frunze de *Atropa belladona* și tuberculi de *Solanum tuberosum* pentru nisip cristalin de oxalat de calciu, catafilele bulbului de *Allium cepa* pentru cristale prismatice și izolate și concrescute sub formă de macle (fig. 83 B, D), frunze și tulpini de *Begonia sp.*, pentru druze sau ursini (fig. 83 A), frunze de *Impatiens* sp. sau *Agave americana* pentru cristale aciculare, izolate și fasciculate (rafide) (fig. 83 C).

Întocmirea preparatelor. Se fac secțiuni fine prin organele respective și se montează pe lamă în 1—2 picături de apă sau gelatină glicerinată.

O tehnică aparte implică utilizarea ca material biologic catafilele bulbului de *Allium cepa*. În acest caz se procedează astfel : se desprind 2—3 catafile de pe bulbul de ceapă și se fierb timp de 10—15 minute într-o soluție de glicerină-apoasă 10—15% pentru îndepărtarea aerului din celule. Cu foarfeca se decupează un fragment de circa 1 cm^2 de catafilă care se montează în apă, glicerină apoasă sau gelatină glicerinată.

Analiza microscopică relevă prezența în celulele mezofilare sau corticale a unor tipuri de cristale de oxalat de calciu (fig. 83 B).

9.5.6. CRISTALE DE SULFAT DE CALCIU

Cristale de sulfat de calciu — reprezintă, de asemenea, produse finale ale metabolismului celular de la unele specii vegetale, depozitate în vacuole. Astfel de cristale romboidale, aflate într-o permanentă și spectaculoasă mișcare browniană pot fi observate în vacuolele terminale ale celulei algei verzi — *Closterium*.

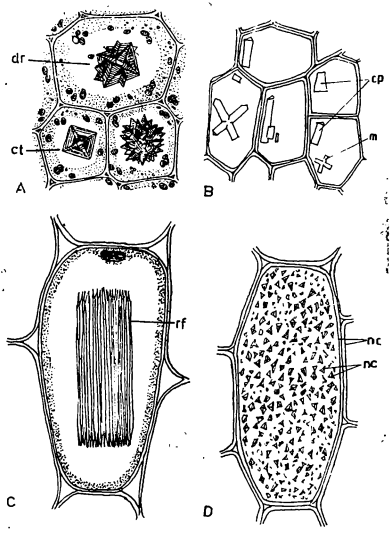


Fig. 83 — Diferite tipuri de cristale de oxalat de calciu : A — druze (dr) și cristale tetragonale (ct) în celulele mezofilare de *Begonia* : B — cristale prismatice (cp) și macle (m) în celulele catafilelor bulbului de *Allium cepa* ; C — rafide (rf) într-o celulă mezofilară de *Impatiens* ; D — nisip cristalin într-o celulă periferică din tuberculul de *Solanum tuberosum*

9.6. TESTE CITOCHIMICE DE EVIDENȚIERE A UNOR CONSTITUENȚI PARIETALI

Peretele, substructură caracteristică celulei vegetale, are o compoziție chimică complexă și variabilă. Afirmația că numărul tipurilor compoziționale este egal cu cel al speciilor vegetale la care se adaugă cel al tipurilor de celule constitutive exprimă neîndoielnic un adevăr.

Din multitudinea de substanțe prezente în constituția peretelui celular de la diferite specii de plante și tipuri de țesuturi vor fi luate în discuție numai cele mai frecvente și caracteristice unui anumit tip de celulă.

CELULOZA — reprezintă substanța organică cu cea mai mare pondere în natură, fiind constituenta-structurală esențială a pereților celulari de la marea majoritate a speciilor vegetale și tipuri de celule.

Cea mai mare parte a celulozei parietale are o structură cristalină ; moleculele sale se asociază formînd fibre celulozice cu rol major în organizarea peretelui celular.

Celuloza se poate pune în evidență prin montarea unor secțiuni fine (prin tulpini, rădăcini, frunze) sau a unor fragmente din talul de *Cladophora* în clorură de zinc, iodată. Pereții celulari primari, constituiți în principal din celuloză, hemiceluloze și substanțe pectice, se colorează în albastru. Aceeași reacție se obține și cu albastru de toluidină. Cu roșu de Congo și carmin alaun celuloza se colorează în roșu.

SUBSTANȚELE PECTICE formează în (sau aproape în) exclusivitate lamela mijlocie. Pot fi puse în evidență folosind secțiuni fine prin frunze, tulpini și rădăcini cu structură primară, fixate în prealabil în amestecul alcool-formol-acid acetic. Secțiunile se țin în apă de Javelle pentru câteva minute (8—10 minute, în funcție de consistența materialului), se spală în apă curentă și se colorează cu roșu de ruteniu sau brun-Bismarck. În lipsa acestor reactivi se pot folosi, cu bune rezultate, albastru de metil sau safranină.

CUTINA, CERURILE, SUBERINA, SPOROPOLENINELE se pot pune în evidență cu o soluție alcoolică 1% de Sudan III sau IV. În acest scop se folosesc secțiuni fine prin frunze, ramuri ale unor plante lemnoase (ex. *Sambucus nigra, Tilia sp.)* și stamine mature. Secțiunile se montează în 2—3 picături de Sudan și se încălzesc (evitînd uscarea) înainte de examinare. Cuticula, țesutul suberos și sporoderma se colorează în portocaliu.

LIGNINA — este un constituient fundamental al pereților celulelor xilematice și sclerenchimatice reprezentînd pînă la 40% din substanța uscată. Are funcție de liant ocupînd toate spațiile intermicrofibrilare, substituind în bună parte hemicelulozele și substanțele pectice.

Reactivul caracteristic este fluoroglucina. Bune rezultate se obțin și prin utilizarea verdelui de iod sau a crisoidinei.

Întocmirea preparatului. Se fac secțiuni fine prin organe vegetative (recomandate sînt ramurile de 2—3 ani de tei, soc și alte plante lemnoase); una sau două secțiuni se depun pe lamă, iar peste acestea cîte 1—2 picături de acid clorhidric concentrat. După 2—3 minute, timp necesar unei ușoare hidrolize acide, excesul de acid clorhidric este absorbit cu o hîrtie de filtru, iar peste secțiuni se depun 2—3 picături de fluoroglucină și se acoperă cu lamela. Analiza microscopică relevă colorarea țesuturilor lignifiate într-un roșu-carmin-intens.

Colorarea cu verde de iod (soluție apoasă 1%) se realizează prin imersionarea secțiunilor în soluție colorantă pentru 1—2 minute, după care se spală în alcool etilic pentru îndepărtarea excesului de colorant. Țesuturile lignificate se colorează în verde, sau verde-albăstrui.

9.6.1. ÎNGROȘĂRI LOCALE

Celulele țesuturilor xilematice, mecanice și apărătoare, îndată ce au atins dimensiunile caracteristice, suferă metamorfozări profunde materializate și prin îngroșarea accentuată a peretelui celular. Această îngroșare este declanșată după stoparea expansiunii (creșterii în suprafață) peretelui celular și constă în depunerea de substanțe noi peste (apoziție) sau printre (intususcepție) cele vechi. Intususcepția ca și apoziția sînt numai arareori uniforme (ex. suberificarea, lignificarea fibrelor sclerenchimatice); de regulă îngroșarea diverselor regiuni ale peretelui celular este inegală, iar uneori strict localizată, centrifugală sau centri-

petală. Ornamentațiile sporodermei granulelor de polen (spinii, veruculii) sînt exemple tipice de îngroșări locale centrifugale, iar cistolitul de îngroșare locală centripetală.

— *Intocmirea preparatului:* Pentru evidențierea îngroșărilor locale centrifugale se montează granule de polen în apă sau glicerină, recoltate de la diferite specii vegetale; recomandate în acest sens sînt: *Hybiscus japonica, Helianthus annuus, Carduus nutans* ș.a.

Cistolitul poate fi observat în celulele hipodermale ale frunzelor de *Ficus elastica* sau *F. carrica*. În acest scop se fac secțiuni transversale prin frunză care se montează în apă curentă (fig. 84).

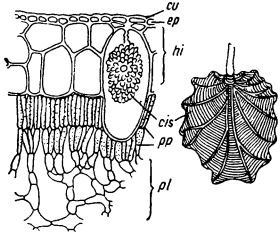


Fig. 84 — Secțiune transversală prin lamina frunzei de *Ficus elastica*. În una din celulele hipodermei se observă prezența cistolitului: cis — cistolit; cu — cuticulă; ep — epiderma superioară; hi — hipodermă; pl — parenchim lacunar; pp — parenchim palisadic.

Cistolitul are forma unui ciorchine, fiind constituit în principal din celuloză și puternic impregnat cu $CaCO_3$. Prezența carbonatului de calciu poate fi demonstrată prin depunerea pe o latură a lamelei a unei picături de HCl concentrat. La scurt timp se observă o oarecare efervescență la nivelul cistolitului, consecință a reacției dintre HCl și $CaCO_3$, materializată prin degajarea CO_2. După solvirea $CaCO_3$ se evidențiază o rețea microfibrilară care conservă în bună parte forma cistolitului. Fibrilele sînt de natură celulozică fapt ce poate fi demonstrat prin colorare cu ClZn + I sau soluția Lugol.

9.6.2. PUNCTUAȚIUNI ȘI PLASMODESME

Cu excepția citorva tipuri de celule specializate, fiecare celulă vie din corpul plantelor superioare (cormi) este conexată cu vecinele sale prin numeroase punți plasmatice, care traversează peretele celular, numite plasmodesme.

În imaginile electronomicroscopice o plasmodesmă apare ca un cordon plasmatic cilindric, de 20—40 nm, delimitat de plasmalemă și traversat prin zona centrală de un profil tubulos (desmotubul) care pare a conexa reticulul endoplasmic din cele două celule. Așadar membrana plasmatică a unei celule este în stare de continuitate cu cea a celulei vecine la nivelul fiecărei plasmodesme.

Marea majoritate a plasmodesmelor se formează în timpul citochinezei cînd are loc formarea în planul ecuatorial a noului perete celular care va bisecta celula parentală.

Plasmodesmele mediază transportul intercelular, care este strict controlat, selectiv.

Punctuațiunile și plasmodesmele pot fi puse în evidență în multe tipuri de celule vegetale; în acest scop recomandat este endospermul seminal de la curmal *(Phoenix dactylifera)*, celulele acestui țesut fiind interconexate de un număr foarte mare de plasmodesme de o deosebită claritate.

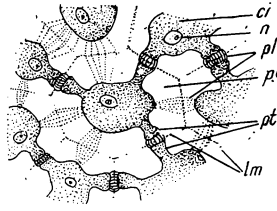


Fig. 85 — Sector din endospermul secundar al seminței de Phoenix dactylifera. Se observă prezența a numeroase punctuațiuni (pt) și plasmodesme (pl); ci — citoplasma; lm — lamela mijlocie; n — nucleu; pc — perete celular.

Întocmirea preparatului — Semințele de curmal se țin cîteva minute în apă pentru înmuierea pereților celulari, după care se secționează. Secțiunile reușite se imersionează pentru o oră într-o soluție concentrată de HK, apoi se transferă pentru 10—12 ore în H_2SO_4, soluție apoasă 25%. În acest interval de timp acidul sulfuric realizează hidroliza parțială a unora din compușii chimici ai peretelui și o puternică imbibiție cu apă a peretelui celular. După o spălare repetată cu apă, secțiunile sînt colorate cu violet de gentiana la care se adaugă cîteva picături de soluție Lugol și se montează în gelatină glicerinată.

Analiza microscopică a preparatelor astfel întocmite revelă prezența a numeroase cordoane plasmatice (plasmodesme) ce interconexează celulele învecinate din țesutul endospermal (fig. 85).

10. METODE PENTRU STUDIUL MITOZEI, MEIOZEI ŞI AL CROMOZOMILOR LA PLANTELE SUPERIOARE

10.1. METODE PENTRU STUDIUL CROMOZOMILOR ÎN MITOZĂ ŞI MEIOZĂ

Studiul cromozomilor la diferite specii de plante şi animale, a arătat că numărul şi forma acestora sînt caracteristice constante şi specifice pentru fiecare specie. În natură se cunosc numeroase specii care aparţin aceluiaşi gen sau unor genuri diferite care au acelaşi număr de cromozomi dar care se deosebesc morfologic, biochimic şi fiziologic. Pe această bază se consideră că numărul şi forma cromozomilor constituie unul din cele mai sigure criterii pentru taxonomia vegetală şi animală.

10.1.1. METODA RAPIDĂ FEULGEN DE COLORARE CU FUXINĂ BAZICĂ LEUCO

(R. Feulgen, A. Rossenbeck, 1921 ; J. A. Tomasi, 1936)

Pentru studiul cromozomilor în mitoză şi meioză se poate folosi cu rezultate metoda rapidă de colorare cu fuxină bazică (reactivul Schiff). În comparaţie cu metoda de includere în parafină a ţesutului şi efectuarea de secţiuni la microtom, metoda Feulgen are avantajul că într-un timp relativ scurt se poate efectua un număr mare de preparate în care cromozomii sînt bine colorati şi etalaţi putînd fi studiaţi morfologic.

Cu ajutorul metodei Feulgen se pot întreprinde o serie de studii, printre care amintim :

— desfăşurarea diviziunii celulare (mitoza şi meioza) şi stabilirea duratei fiecărei faze a diviziunii ;

— stabilirea numărului de cromozomi la diferite specii ;

— studiul morfologiei cromozomilor şi a modificărilor morfologice şi numerice care apar sub acţiunea unor factori mutageni sau hibridării interspecifice şi intergenerice etc.

Deşi diviziunea celulară se desfăşoară continuu, din motive didactice stadiile diviziunii sînt grupate în patru faze principale cu numeroase stadii intermediare ; profaza, metafaza, anafaza, telofaza.

Materiale necesare. Pentru evidenţierea diviziunii mitotice se folosesc radicele embrionare de ceapă *(Allium cepa* 2n = 16), secară *(Secale cereale* 2n = 14) ; bob *(Vicia faba* 2n = 12), orz *(Hordeun vulgare*

2n = 14), lame, lamele, alcool etilic, xilen (toluen, benzen), acid acetic glacial, fuxina bazică, carmin-acetic, orceină-acetică.

Modul de lucru. Materialul biologic se pregătește astfel : semințele sînt puse la germinat în vase Petri pe hîrtie de filtru îmbibată în apă. Bulbii de ceapă se plasează deasupra unui vas de sticlă (borcan. Berzelius, Erlenmayer) umplut cu apă de robinet, în așa fel încît discul (tulpina adevărată) să fie scufundat în apă. Se recomandă ca apa să fie schimbată zilnic. În condiții optime de temperatură (20—22°C) semințele germinează în 2—3 zile. Radicelele embrionare se recoltează în momentul în care au 5—10 mm. Pentru a se acumula un număr mai mare de metafaze se sugerează ca semințele germinate să fie supuse unui șoc de temperatură (vasele cu semințele germinate se introduc în frigider pentru 30—60 de minute după care se tranferă într-un termostat, reglat la 30°C sau se plasează pe un calorifer sau sub o lampă de birou pentru 1—2 ore). Radicelele embrionare, în lungime de 5—10 mm, se recoltează cu ajutorul unei foarfeci, pense, ac spatulat și sînt supuse următoarelor operații de prelucrare : prefixare, fixare, hidroliză și colorare.

Prefixarea. Radicelele embrionare se recoltează în fiole de sticlă (∅ 10 mm și 4,5 cm lungime) sau flacoane de medicamente cu capacitatea de 10 ml, în care se găsește α-bromonaftalena ($C_{10}H_7Br$) sau hidroxichinoleină 0,03%. Radicelele sînt menținute în prefixator timp de 3—5 ore. Sub acțiunea prefixatorului are loc blocarea formării fusului de diviziune sau distrugerea lui și acumularea astfel în țesutul meristematic din vîrful radicelelor a unui număr mare de metafaze cu cromozomi bine individualizați. Se recomandă ca la soluția prefixatoare să se adauge 2—3 picături de colchicină 0,1—1%; colchicina determină clivarea cromozomilor și evidențierea tipului morfologic de cromozomi.

Dacă dorim să observăm toate fazele diviziunii celulare se renunță la prefixare și materialul este recoltat direct într-o soluție fixatoare.

Fixarea se realizează în alcool-acetic 3 : 1 (3 părți alcool etilic absolut și 1 parte acid acetic glacial) sau în fixatorul Carnoy (6 părți alcool etilic absolut, 1 parte acid acetic glacial și 3 părți cloroform). Fixatorul are rolul de a mori celulele și de a asigura coagularea constituienților celulari, evitînd pe cît posibil modificarea structurii interne a celulei.

Prefixatorul din fiole cu radicele este înlocuit cu fixatorul. Se folosesc 2—3 ml de fixator în așa fel încît radicelele să fie imersionate în soluție. Fiolele cu radicele aflate în fixator se păstrează la temperatura scăzută (+4°C) timp de 12—15 ore. Materialul poate fi prelucrat în continuare sau după mai mult timp, alcoolul fiind un bun conservant.

Hidroliza se efectuează cu HCL N/1 încălzit la 60°C. Pentru executarea acestei operații se procedează astfel : din fiolele cu radicele se îndepărtează fixatorul și se adaugă HCl N/1, încălzit la 60°C și se introduc pentru 10—20 minute, în termostat reglat la 60°C. Acidul clorhîdric normal se prepară astfel: 82,5 cc acid clorhidric cu d = 1,19 și 1000 cm^3 apă distilată. Timpul necesar realizării hidrolizei depinde de compoziția peretelui celular și se stabilește pentru fiecare specie, prin tatonări. HCl asigură macerarea țesutului prin dizolvarea parțială a substanțelor pectice din peretele celular și ușurează etalarea celulelor.

Colorarea, se efectuează cu o soluție de fuxină bazică (reactivul Schiff) care se recolorează la nivelul cromozomilor în roșu violaceu.

Colorarea se realizează în mai multe etape :

— În timpul hidrolizei cu HCl normal 1 are loc eliberarea grupărilor aldehidice din ADN ;

— Între grupările aldehidice eliberate și fuxina bazică are loc o reacție chimică ce determină o colorație roșie-violacee la nivelul cromozomilor.

Reactivul Schiff se prepară astfel : se ia 1 g fuxină bazică cristale și se macină pentru obținerea unei pudre. Pudra se toarnă într-un balon de sticlă în care se află 200 cc apă distilată încălzită la 100°C. Se agită și se lasă să se răcească la 50°C. Se filtrează și se adaugă 30 cc acid clorhidric 1N și 3 g metabisulfit de potasiu ($K_2S_2O_5$) sub formă de cristale. Soluția astfel pregătită se transferă într-o sticlă colorată și se păstrează la întuneric și temperatură scăzută timp de 24 ore. În acest timp soluția devine gălbuie și pentru decolorare se adaugă 0,5 g cărbune vegetal activ. După câteva minute se filtrează. Soluția se păstrează în sticle colorate și la rece (frigider). Pentru a evita recolorarea se adaugă 2—4 g metabisulfit de potasiu (fig. 86, 87, 88).

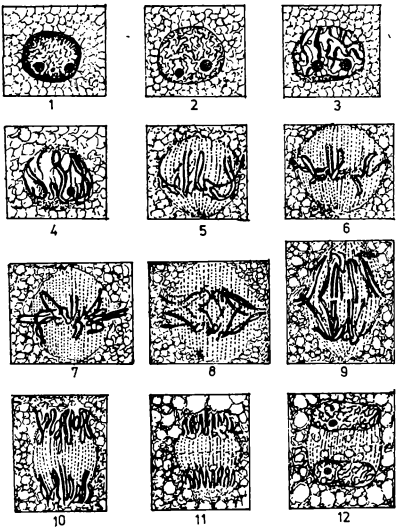


Fig. 86 — Diagrama diviziunii mitotice (E. Strasburger, 1977). 1 — interfază ; 2—4 — profaza ; 5—6 — metafaza ; 7—9 anafaza ; 10 — telofaza târzie ; 11 — fragmoplast ; 12 — Cei doi nuclei-fii.

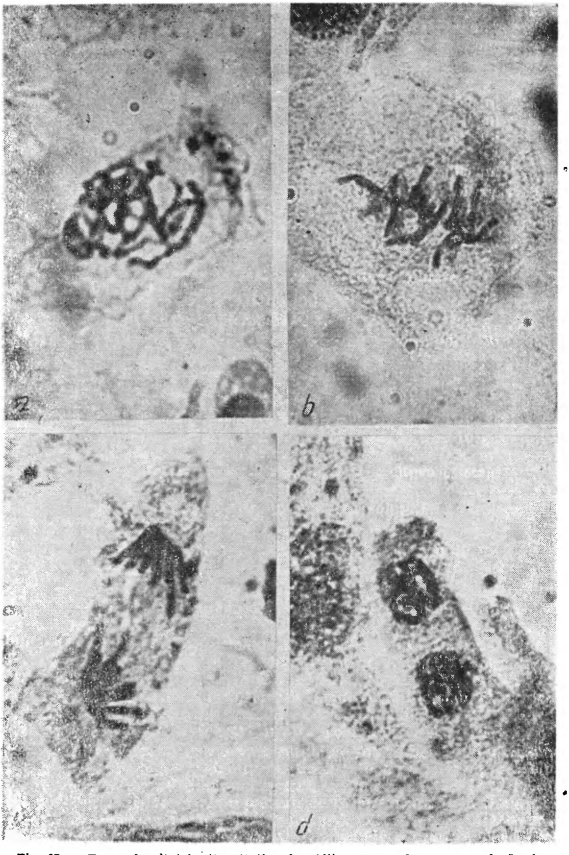


Fig. 87 — Faze ale diviziunii mitotice la *Allium cepa L.* a — profază ; b — **metafază ; c — anafază ; d — telofază.**

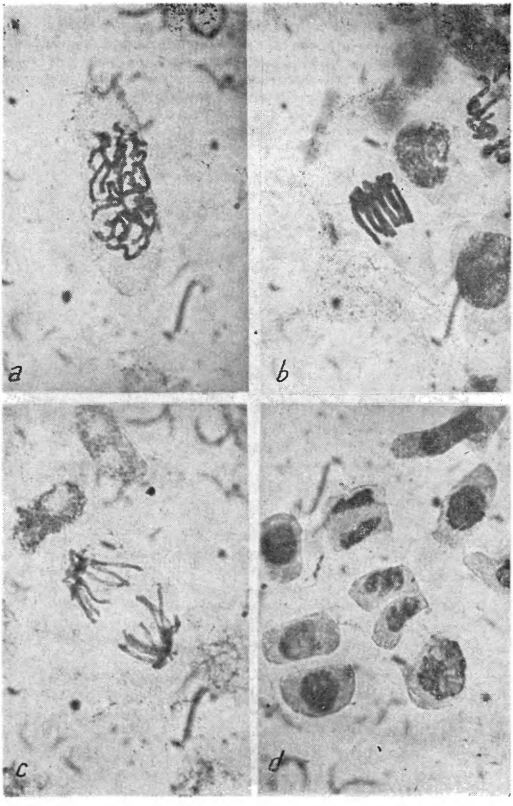


Fig. 88 — Diviziunea mitotică la *Aloë barbadense*: a — profază; b — metafază; c — anafaza; d — telofaza.

După ce se realizează hidroliza se îndepărtează HCl și se adaugă 2—3 ml de fuxină bazică. Pentru a se obține o colorare de calitate superioară se recomandă să se îndepărteze orice urmă de HCl, cu ajutorul unei hîrtii de filtru sau prin spălare cu apă distilată. După 10—15 minute, vîrful radicelei, unde este localizat țesutul meristematic și deci frecvența diviziunii celulare este mai mare și care se folosește pentru studiu, se colorează în roșu violaceu. Pentru intensificarea colorării se recomandă ca preparatele să fie montate în carmin acetic sau orceină acetică.

10.1.2. METODA DE COLORARE CU CARMIN ACETIC

Prefixarea materialului biologic (radicelele embrionare, frunze tinere) se poate realiza prin imersionarea în emulsie de α-bromonaftalena sau soluție apoasă de 8—hidroxichinolină-orto timp de 3—3,30 ore.

Hidroliza și *colorarea* se fac în același timp. Într-o capsulă de porțelan sau sticlă de ceas, în care se pune puțină soluție de carmin, se introduc radicelele. Se încălzește timp de 2—3 minute ,la flacăra unei lămpi de spirt evitînd fierberea. Pentru hidroliza materialului se adaugă cîteva picături de HCl normal.

Se efectuează preparate de tip squash.

10.1.3. METODA DE COLORARE CU ORCEINĂ ACETICĂ

Prefixarea radicelelor embrionare se face cu emulsie de α-bromonaftalena sau 8-hidroxichinoleină orto 0,03%, timp de circa 5 ore la temperatura de 0—4°C.

Fixarea se realizează în alcool etilic-acid acetic glacial 3 : 1 sau alcool etilic-acid acetic glacial-cloroform 6 : 1 : 3, timp de 12—24 ore. Fixatorul, avînd în compoziție alcool etilic poate conserva materialul biologic timp de mai multe zile.

Hidroliza și colorarea se efectuează în același timp în soluție de orceină acetică care se prepară din 46 cc soluție standard (rezervă) și 55 cc apă distilată.

Soluția standard de orceină se prepară din 2,3 g orceină și 100 cc acid acetic glacial. Orceina se dizolvă în acidul încălzit, după care se continuă fierberea încă 2—3 minute.

Orceina acetică se pune într-o capsulă de porțelan (sticlă de ceas) în care se găsește materialul de studiat (radicele, frunze, stamine) se încălzește la flacăra unui bec Bunzen sau lampă de spirt 2—3 minute, evitînd fierberea. Timpul de fierbere se stabilește în funcție de duritatea țesuturilor. Pentru ușurarea hidrolizei în colorant se adaugă 2—3 picături de acid clorhidric normal.

Se efectuează preparate de tip squash.

10.1.4. METODA DE COLORARE CU RESORCINA ACETICA

Se folosesc radicele embrionare care se pregătesc astfel :

Fixarea radicelelor se face în alcool etilic absolut — acid acetic glacial 3 : 1, timp de 12—24 ore.

Hidroliza și colorarea se efectuează în același timp, cu ajutorul unei soluții de rezorcină-acetică, care se prepară prin diluarea soluției standard.

Soluția standard sau de rezervă . . . . . 45 cc
Apă distilată . . . . . 55 cc

Soluția standard se prepară astfel :

Resorcina . . . . . 2,2 g
Acid acetic glacial . . . . . 100 cc

Amestecul rezorcină-acid acetic se fierbe cîteva minute pînă are loc dizolvarea completă a colorantului. După răcire se filtrează.

Pentru efectuarea hidrolizei și a colorării, materialul biologic fixat se transferă într-o sticlă de ceas sau capsulă de porțelan peste care se adaugă rezorcină-acetică și cîteva picături de HCl normal.

Pentru a asigura o colorare mai rapidă și intensă, se încălzește la flacăra unui bec Bunzen sau lampa de spirt, timp de 2—3 minute, evitînd fierberea. Pentru a mări contrastul între cromozomi și citoplasmă se recomandă ca materialul să fie spălat în apă distilată.

Se execută preparate de tip squash.

10.1.5. METODA DE COLORARE CU NEGROSINĂ ACETIĂ

Prefixarea se face cu soluție de 8-hidroxichinoleină orto 0,03%. Soluția se pregătește în apă distilată încălzită la temperatura de 50—60°C și se păstrează în sticle colorate. Prefixarea radicelelor embrionare sau a frunzelor tinere se realizează în 3 ore.

Fixarea se efectuează în alcool-acid acetic glacial 3 : 1, timp de 12—24 ore.

Hidroliza se realizează cu un amestec de alcool etilic-acid clorhidric 4 : 1. Timpul de hidroliză se stabilește pentru fiecare tip de țesut. Înainte de colorare materialul se spală în apă distilată pentru îndepărtarea completă din țesuturi a amestecului de alcool etilic-acid clorhidric.

Colorarea se face cu o soluție de nigrosin-acetică, care se prepară astfel :

nigrosină . . . . . 20 g
acid acetic glacial . . . . . 250 cc
apă distilată . . . . . 250 cc

Într-un vas Erlenmayer se amestecă acidul acetic glacial și apa distilată și se fierbe. La atingerea temperaturii de 100 C se adaugă nigrosina și se continuă fierberea timp de 8 minute. Se răcește și se filtrează. Soluția se păstrează la întuneric, timp de cel puțin 10 zile, după care se poate folosi pentru colorare.

Se efectuează preparate de tip squash.

Pentru studiul diviziunii mitotice cu ajutorul metodelor rapide se renunță la prefixare, materialul biologic (rădăcini sau frunze tinere) este supus fixării.

10.1.6. STUDIUL CROMOZOMILOR CU AJUTORUL FLUOROCROMILOR

Studiul cromozomilor cu ajutorul fluorocromilor dă posibilitatea evidențierii regiunilor eucromatice și heterocromatice, care apar sub forma unor benzi-luminoase și întunecoase, cunoașterii structurii și comportamentului materialului gentic. Fluorocromii dau astfel posibilitatea identificării cu mai mare ușurință și precizie a cromozomilor omologi, a abe-

rațiilor cromozomale induse de substanțe chimice sau factori fizici mutageni etc.

Studiul organizării și morfologiei cromozomilor cu ajutorul fluorocromilor a fost inițiat de T. Casperson și col. (1968), care au demonstrat că anumiți derivați ai acridinei, cum sînt : quinacrina (Q) și quinacrina muștar (QM) prezintă un înalt grad de fluorescență, se localizează preferențial de-a lungul cromozomilor.

Tehnica folosită de C. Vosa (1970) cuprinde următoarele etape : Semințele se pun la germinat în vase Petri pe hîrtie de filtru îmbibată cu apă de robinet ; bulbii se plasează deasupra unor pahare (borcane) umplute cu apă de robinet, în așa fel încît discul (tulpina adevărată) să fie scufundat în apă. Se creează condiții optime de temperatură și aerisire. După formarea radicelelor de 5—10 mm acestea se recoltează în fiole de sticlă și se tratează cu soluție apoasă de colchicină 0,05%, timp de 5 ore.

— Se fixează în alcool etilic-acid acetic glacial 3 : 1, timp de 12—15 ore.

Materialul fixat se păstrează în alcool etilic 95% la temperatura de 4—6°C.

— Se efectuează preparate de tip squash în apă acetică 45%.

— Lamela se desprinde fie prin metoda dry-ice (uscare-răcire) sau dacă se folosește albumina glicerinată pentru fixarea materialului, lamela se desprinde prin introducerea preparatului cu lamela în jos într-un vas (cutie Petri) cu apă acetică.

— Colorarea se face prin imersionarea lamei și lamelei în soluție apoasă de quinacrină 0,5% timp de 10—15 minute. Se poate folosi și soluție de quinacrină 1% în alcool absolut.

Preparatele se spală în apă distilată și se montează în apă acetică. Pentru a se evita evaporarea apei și uscarea preparatelor se recomandă ca în jurul lamelei să se depună o peliculă de soluție de lipit cauciuc sau parafină. Preparatele semipermanente păstrate la rece (în frigider) pot fi studiate 2—3 zile.

Se efectuează microfotografii și se studiază repartiția heterocromatinei și eucromatinei în structura cromozomilor.

10.1.7. COLORAREA DIFERENȚIATĂ CU SOLUȚIE GIEMSA

Se folosesc țesuturi meristematice radiculare care se recoltează între orele 8—9 ; 14—15 sau 22—0, perioadă în care se apreciază că frecvența mitozelor este ridicată. Materialul biologic se prelucrează după următoarea tehnică :

Pretratament — cu soluție de colchicină 0,05% timp de 2 ore ;

Fixarea se efectuează cu alcool etilic-acid acetic glacial 3 : 1, timp de 18—24 ore și conservat în alcool etilic 70%, în frigider ;

Hidroliza se realizează cu acid acetic 45% și HCl 1N încălzit la 60°C timp de 12—14 minute.

Preparatele citologice obținute au fost denaturate cu soluție de hidroxid de bariu, timp de circa 7 minute și renaturat în 2 x SSC la 60°C timp de o oră (metoda Marks, 1975).

Colorarea. Se folosește soluție Giemsa 2%, preparată în soluție tampon Sörensen (pH=6,8), timp de 30—60 minute.

Hidroliza joacă un rol important în evidențierea heterocromatinei. S. Siljak-Yakovlev și D. Cartier (1979), au observat că hidroliza cu HCl 1N determină colorarea de către soluția Giemsa a heterocromatinei din regiunile centromerice, iar hidroliza cu acid acetic 45% evidențiază benzile heterocromatice intercalare și terminale. În același timp hidroliza cu HCl 1N permite colorarea centromerilor putîndu-se astfel stabili poziția lor, care nu este facilitată totdeauna din metoda clasică, iar hidroliza cu acid acetic asigură o analiză mai fină a repartizării heterocromatinei în lungul cromozomului (S. Siljak-Yakovlev și D. Cantier, 1979).

10.2. STUDIUL MEIOZEI LA PLANTE

Din ce în ce mai frecvent se folosesc și în studiul meiozei metode rapide înlocuind treptat metoda clasică de includere în parafină și efectuarea de secțiuni la microtom.

Pentru studiul meiozei se recomandă speciile: *Secale cereale* (2n=14), *Triticum aestivum* (2n=42), *Hordeum vulgare* (2n=14), *Zea mays* (2n=20).

Se apreciază că meioza are loc în momentul în care spicele sînt încă în burduf și au o lungime de 4—6 cm la grîu și orz și 6—7 cm la secară. Pentru deplina reușită a studiului se recomandă ca înainte de recoltare să se stabilească stadiul dezvoltării celulelor mame ale grăunciorilor de polen. Pentru aceasta se recoltează un spic înainte de a ieși din burduf și se scot staminele dintr-o floare. Se realizează un preparat *squash*. Dacă celulele se află în diviziune și în special în metafază, se poate trece la recoltarea materialului. În cazul în care celulele se află într-un stadiu mai tînăr sau se observă deja granule de polen se testează spice mai mari și respectiv mai mici.

Spicele se recoltează în primele ore ale dimineții și se introduc imediat într-un amestec de alcool etilic-acid acetic glacial 3 : 1. Timpul de fixare se stabilește pentru fiecare specie și variază de la cîteva minute pînă la 24 ore. După fixare spicele sînt trecute în cîteva băi de alcool etilic absolut, pentru deshidratare și îndepărtarea acidului acetic. Materialul astfel fixat, spălat și deshidratat poate fi conservat în fiole cu alcool de 70°, care se închid ermetic prin parafinare și se păstrează la frigider la 0—4°C. În aceste condiții materialul biologic se poate păstra timp îndelungat.

Pentru studiul meiozei, materialul este supus operațiilor de hidroliză și colorare.

Hidroliza. Spicele conservate în alcool 70° sînt spălate în apă timp de 30 minute. Se scot anterele din spic și se hidrolizează în soluție de HCl normal, la temperatura de 60°C, un timp ce variază între 8—12 minute (8—9 minute la grîu, orz, 9—10 minute la porumb, 10 minute la secară, pepene verde etc.).

Dacă colorarea se realizează în carmin acetic sau orceină acetică se poate renunța la hidroliză.

Colorarea se efectuează cu fuxină bazică (reactivul Schiff) sau cu carmin acetic (orceină acetică). Se recomandă ca materialul să nu fie

menținut un timp prea îndelungat în colorant, deoarece se reduce contrastul dintre culoarea cromozomilor și a citoplasmei, iar preparatele sînt de calitate inferioară.

10.2.1. EFECTUAREA PREPARATELOR MICROSCOPICE

Pe o lamă de sticlă degresată și uscată se pune o picătură de apă acetică 45% sau carmin acetic în cazul în care materialul nu este colorat suficient, în care se introduc o stamină recoltată dintr-o floare de la mijlocul spicului. Cu un ac spatulat sau bisturiu se secționează transversal stamina. Prin ușoare presări cu acul spatulat se eliberează conținutul sacilor polinici format din celulele mame ale grăuncioriior de polen. Se îndepărtează pereții anterei. Peste material se pune o lamelă pe care se află un strat foarte fin de albumină glicerinată, trecută prin flacăra unei lămpi de spirt. Cu ajutorul unei bucăți de hîrtie de filtru se îndepărtează excesul de colorant, iar prin apăsare cu degetul mare se face o ușoară etalare. Preparatul astfel pregătit poate fi observat la microscop.

Imaginea preparatului se prinde cu obiectivul 10 iar observațiile propriu-zise se realizează cu obiectivele 20 și 40.

Se pot evidenția și interpreta toate etapele diviziunii reducționale (meioză) ; profaza-leptoten, zigoten, pachiten, diploten, diachineza ; metafaza I și I, anafaza I și II, telofaza I și II, diadele, tetradele (fig. 89, 90).

În situația în care în preparat se observă numai celule tinere care nu au intrat în diviziune se recomandă recoltarea staminelor dintr-un spic mai mare, iar dacă se observă grăuncioare de polen, se recoltează stamine din florile plasate mai la vîrful sau la baza spicului sau se iau spice mai tinere.

Pentru a păstra preparatele cîteva zile se poate parafina marginea lamelei sau se poate pune soluție de lipit cauciuc. Cele mai bune preparate se permanetizează prin montarea în euparal sau balsam de Canada.

Pentru colorarea cu carmin acetic sau orceină acetică se procedează astfel : se scot staminele și se pun într-o capsulă de porțelan în care se află carmin acetic (orceină acetică). Colorarea se realizează în 5—10 minute. Preparatele se montează în apă acetică 45% sau carmin acetic.

Studiul diviziunii reducționale efectuat la diferite linii tetraploide și triploide obținute pe cale experimentală aparținînd diverselor specii de plante a demonstrat că meioza prezintă anumite caracteristici datorită numărului mai mare de cromozomi omologi. La speciile polioploide studiate s-a observat numeroase abateri în procesul de reducere cromozomală care constau mai ales în asocierea cromozomilor omologi sub forma de multivalenți (tetra- și trivalenți), în apariția a numeroase anomalii ; celule cu univalenți, cromozomi retardatari, diviziuni asincrone, punți cromatice, micronuclei, celule multipolare (triade, pentade). Ca urmare procesul de separare și migrare a cromozomilor în anafaza I și telofaza I se desfășoară anormal, astfel că în urma diviziunii rezultă gameți aneuploizi ($n \pm 1$, $n \pm 2$).

S-a demonstrat că fertilizarea mai scăzută a liniilor tetraploide și sterilitatea completă a triploizilor sînt rezultatul apariției, în cursul diferitelor faze ale diviziunii reducționate (meioza) din micro- și macrosporogeneză a anomaliilor cromozomale amintite.

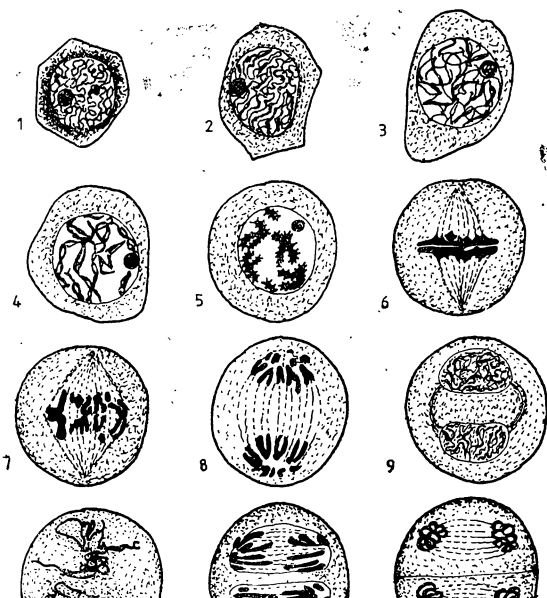


Fig. 89 — Diagrama diviziunii meiotice (E. Strasburger, 1971) 1—9 — diviziunea heterotipică; 10—12 — diviziunea homotipică; 1—5 profaza I: 1— leptoten ; 2 — zigoten ; 3 — pachiten ; 4 — diploten ; 5 — diakineză ; 6 — metafază I ; 7 — anafaza I — timpurie ; 8 — telofaza I ; 9 — interfaza meiotică (stadiul de diadă) ; 10 — metafaza II ; 11 — anafaza II ; 12 — telofaza II.

Tehnica efectuării preparatelor

La mijlocul unei lame de sticlă curată și uscată se pune o picătură de carmin acetic, orceină acetică, fuxină sau apă acetică 45%. Se alege o radicelă al cărui vîrf este colorat intens și se așează pe lamă. Cu ajutorul unui ac spatulat sau bisturiu se detașează vîrful unei radicele

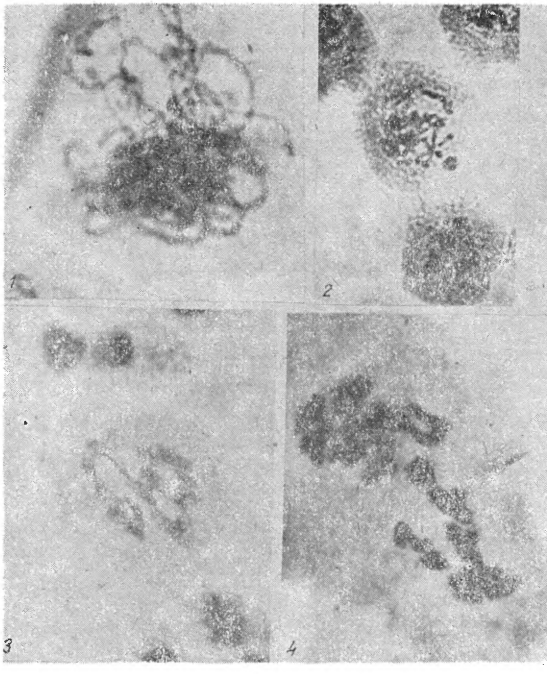
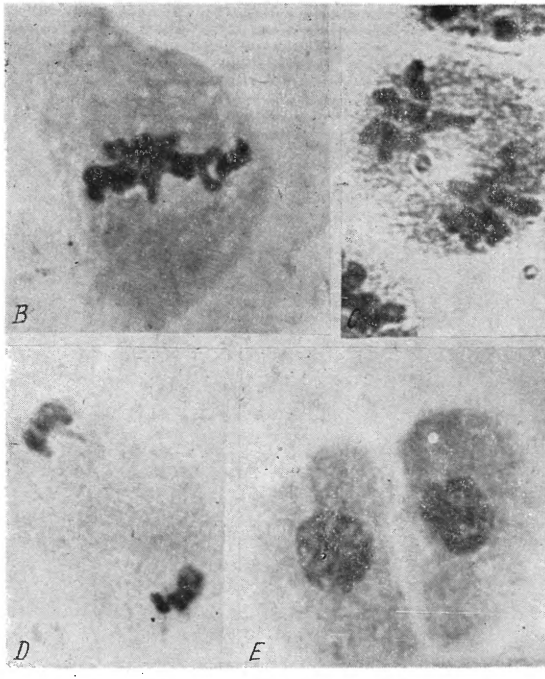


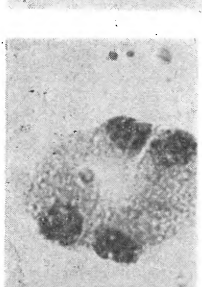
Fig. 90 — Diviziunea meiotică în microsporocitele de *Secale cereale:* 1—4 — profaza I (1 — leptoten ; 2 — zigoten ; 3 — pachiten ; 4 — diachineză ; B — metafaza I, C și D — anafaza I ; E — telofaza I ; F — metafaza II ; G — anafaza II ; H — telofaza II ; I — tetradă haploidă.

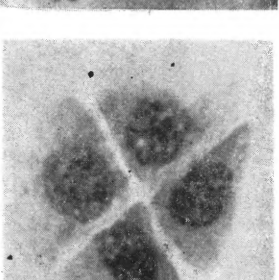
(1—2 mm) și se introduce în soluția de pe lamă. Peste material se plasează o lamelă. Peste lamelă o bucată de hîrtie de filtru (sugativă) și prin o ușoară presare cu degetul mare se îndepărtează excesul de colorant. Pentru etalarea celuleror într-un singur strat se execută loviri ușoare în lamelă cu un bețișor de lemn sau plastic.



Pentru fixarea unui număr cît mai mare de celule se recomandă ca lamela să fie acoperită pe fața care se plasează pe lamă cu un strat fin de albumină glicerinată.

Pentru ca preparatele astfel pregătite să se poată studia mai multe zile se recomandă parafinarea marginilor lamelei pentru a împiedica evaporarea soluției în care este montat materialul și uscarea preparatului. Preparatele pot fi studiate mai multe zile prin păstrarea lor la temperatură scăzută.





Preparate permanente

Preparatele realizate după tehnica descrisă și în care se găsește un număr mare de diviziuni, cu cromozomii bine individualizați și colorați, sînt permanentizate. Pentru obținerea unor preparate durabile se procedează astfel : cu ajutorul unei lame de ras se desprinde lamela de lamă. Se introduce colțul unei lame de ras (ac spatulat) sub lamelă și cu o singură mișcare se desprinde de lamă, evitînd deteriorarea preparatului. Se efectuează deshidratarea materialului biologic prin introducerea lamei și lamelei într-o serie de pahare Borell, cu alcool etilic absolut și xilol (2 pahare Borell cu alcool etilic absolut, 1 pahar Borell cu alcool etilic absolut 50% și xilol 50%, 1 pahar Borell cu alcool etilic

absolut 25% și xilol 75%, 2 pahare Borell cu xilol). În loc de alcool etilic absolut se poate folosi alcool metilic, sau toluen (benzen) în loc de xilol. Lama și lamela sînt trecute prin xilol, deoarece alcoolul care se folosește pentru deshidratare nu este miscibil cu balsamul de Canada, acesta fiind miscibil numai cu xilolul, toluenul sau benzenul.

Pentru deshidratarea materialului de pe lamelă se folosesc aceleași soluții care se pun în capsule de porțelan sau sticle de ceas.

În fiecare soluție, lama și lamela sînt lăsate 2—3 minute. După scoaterea dintr-o soluție și înainte de a fi introduse în soluția următoare, lama și lamela sînt scurse pe o hîrtie de filtru. Montarea preparatelor se realizează astfel : se scoate lama din ultimul pahar în care se găsește xilol (toluen sau benzen), se scurge pe o hîrtie de filtru, iar în regiunea în care a fost etalat materialul biologic se pune o picătură de balsam de Canada. Deasupra acesteia se plasează lamela cu fața care s-a aflat inițial pe lamă. Peste lamelă se așează o hîrtie de filtru și prin presare cu degetul mare se fixează lamela și se îndepărtează excesul de balsam de Canada.

În cazul în care se folosește euparal, după deshidratarea cu alcool, preparatele pot fi montate, euparalul fiind miscibil cu alcoolul.

Preparatele sînt păstrate timp de 6—7 zile la temperatura camerei, la un loc ferit de praf și umezeală în cutii special confecționate, pentru a se usca. După uscare preparatele se etichetează cu denumirea speciei, numărul de cromozomi, data și numele celui care le-a realizat. Preparatele durabile (permanente) pot fi folosite pentru studiu și demonstrații un timp îndelungat.

10.3. STUDIUL CARIOTIPULUI LA PLANTE

Analiza cromozomilor în cercetările de citologie, genetică și taxonomie, cît și activitatea de obținere a unor noi forme de plante și animale, cu caracteristici biologice și economice superioare, prin hibridare, poliploidizare și mutageneză, au determinat elaborarea și utilizarea unor criterii unice de clasificare și caracterizare a cromozomilor. Astfel în 1960 la Denver (S.U.A.) au fost elaborate criteriile de alcătuire a cariotipului uman, perfecționate și definitivate cu prilejul conferințelor internaționale ce au avut loc la Londra (1963) și Chicago (1966). Cu prilejul conferinței de la Denver s-a definit noțiunea de cariotip. Prin cariotip, după H. Hughes (1966), se înțelege o aranjare sistematizată a cromozomilor unei celule mitotice sau meiotice implicînd numărul, forma, mărimea sau orice altă caracteristică care poate fi reprezentativă pentru complementul cromozomal al unei varietăți celulare, individ sau specie.

Cromozomii sînt studiați în metafază cînd sînt complet individualizați și se colorează mai intens. Pentru alcătuirea unui cariotip se iau în considerație următoarele caracteristici : lungimea brațelor cromozomilor, lungimea totală a cromozomilor, poziția centromerului și forma cromozomilor dată de acesta, poziția constricțiilor secundare.

Poziția centromerului, care definește forma morfologică a cromozomilor, se exprimă cu ajutorul relației :

$$d = l - s \text{ sau } r = \frac{l}{s} \text{ în care :}$$

l = lungimea brațului lung al cromozomului

s = lungimea brațului scurt al cromozomului
d = diferența între brațul lung și cel scurt
r = raportul între brațe

Raportul între brațele cromozomilor este frecvent calculat sub forma unui index centromeric (Denver, 1960).

$$I = \frac{100\,S}{c}$$

Dacă se cunoaște lungimea cromozomilor (c = lungimea unui cromozom raportată la lungimea totală a unui complement cromozomal haploid) și valorile r sau i, l și s se pot calcula cu ajutorul relațiilor :

$$l = \frac{c \cdot r}{r + i} \qquad s = \frac{c}{r + i}$$

$$l = \frac{c(100 \times i)}{100} \qquad s = \frac{i \cdot c}{100}$$

Diferența dintre brațul lung și brațul scurt
(A. Levan ; K. Fredga, A. Sandberg, 1964)

Nomenclatura	Diferența dintre brațul lung și cel scurt (d)	Raportul dintre brațe (r)	Indexul centromeric (i)
M	0,0	1,00	50,0
m	0,5	1,05	47,5
	1,0	1,22	45,0
	1,5	1,35	42,5
	2,0	1,50	40,0
	2,5	1,67	37,5
sm	3,0	1,86	35,0
	3,5	2,08	32,5
	4,0	2,33	30,0
	4,5	2,64	27,5
	5,0	3,00	25,0
st	5,5	3,44	22,5
	6,0	4,00	20,0
	6,5	4,71	17,5
	7,0	5,67	15,0
	7,5	7,00	12,5
t	8,0	9,00	10,0
	8,5	12,33	7,5
	9,0	19,00	5,0
	9,5	39,00	2,5
T	10,0	∞	0,0

După cum se observă din fig. 92 cromozomul a fost împărțit în 10 unități. Poziția centromerului variază din regiunea mediană către centromerul terminal.

Valorile d și r se calculează astfel :

$$d = \frac{10(r-1)}{r + 1} \qquad r = \frac{10 + d}{10 - d}$$

În funcție de poziția centromerului, A. Levan (1964) a propus următoarele tipuri de cromozomi :

— *cromozomi metacentrici* — cu centromerul situat în punctul median (M) sau în regiunea mediană (m) și cu un raport al brațelor de 1,0—1,7 ;

— *cromozomi submetacentrici* — cu centromerul situat în regiunea submediană (sm) și raportul brațelor de 1,7—3,0 ;

— *cromozomi subtelocentrici* — cu centromerul în regiunea subterminală și raportul brațelor cuprinse între 3,0—7,0 ;

— *cromozomi acrocentrici* — cu centromerul în regiunea terminală (t) (fig. 91, 92).

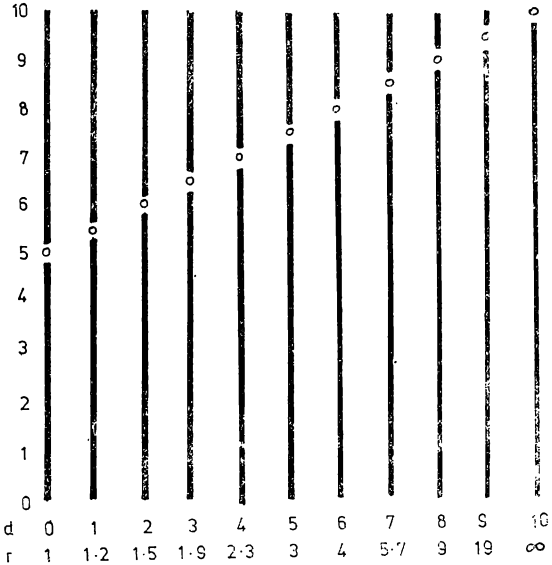


Fig. 91 — Reprezentarea diagramatică a tipurilor morfologice de cromozomi în funcție de poziția centromerului : d = braț lung — braț scurt ; r = raportul dintre brațul lung asupra brațului scurt (A. Levan, K. Fradga, A. Sandberg, 1964).

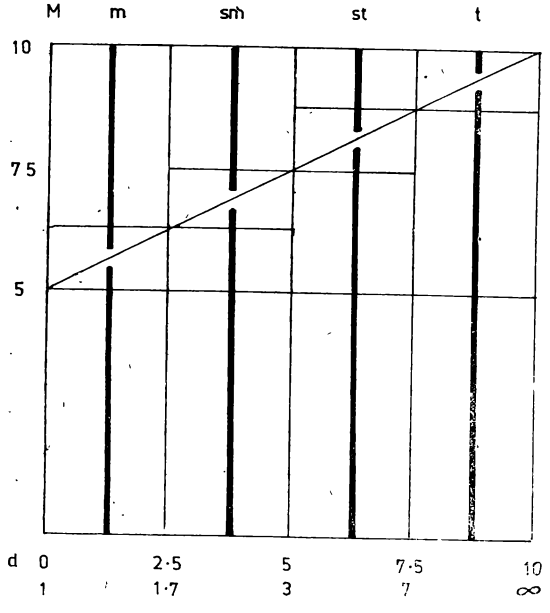


Fig. 92 — Reprezentarea diagramatică a tipurilor morfologice de cromozomi. M — metacentrici (cu centromerul median) m — metacentrici (cu centromerul în regiunea mediană) ; sm — submetacentrice ; st — subtelomerice ; t — acrocentrice ; T — telocentrice.

În prima etapă a elaborării unui cariotip, cromozomii se clasifică în două grupe : *cromozomi mediani* și *submediani* (m și sm) și cromozomi terminali și subterminali (t și st). În felul acesta fiecare cromozom este împărțit în patru regiuni egale (m, sm, st, t) fiecare jumătate a cromozomului fiind subdivizată în patru. Prin aceasta se stabilește poziția centromerului și forma cromozomului (A. Levan, 1964).

În practica de laborator se folosește nomenclatura ce se bazează pe clasificarea cromozomilor în *cromozomi mediani* (m) și *submediani* (sm), *subterminali* (st) și *terminali* (t).

Termenul	Valoarea d	Valoarea r
M	0	1
m, sm	0— 5	1— 3
st, t	5—10	3—∞
t	10	∞

Această clasificare a fost folosită frecvent pentru studiile de citogenetică.

Battaglia (1956) și Sinoto (1963) au elaborat terminologii noi pe baza acestui sistem general.

Pentru elaborarea cariotipului la anumite specii se recomandă un sistem care se prezintă astfel :

Cariotipul la plante se efectuează pe baza criteriilor folosite la animale : mărimea cromozomilor, raportul brațelor cromozomale, poziția centromerului, prezența sateliților etc.

Termenul	Valoarea d	Valoarea r
m	0,0— 2,5	1,0—1,7
sm, st	2,5— 7,5	1,7—7,0
t	7,5—10,0	7,0—∞

Un cariotip se realizează în mai multe etape :

— Se efectuează preparate permanente de tip squash, materialul biologic se pregătește după metoda Feulgen ;

— Se aleg cele mai bune preparate microscopice în care cromozomii sînt în metafază, sînt bine etalați și răspîndiți în întreaga celulă. Se reține pentru studiu metafazele care au un număr diploid de cromozomi. Metafazele cu unul sau mai mulți cromozomi în plus sau în minus, cu cromozomi suprapuși sau cu diferite aberații morfologice (deleții, etc.) sînt eliminate din studiu. În metafază cromozomii sînt bine individualizați și au o formă relativ constantă pentru o anumită specie și se colorează ușor cu coloranți specifici (fig. 93).

— Se studiază morfologia cromozomilor și se efectuează măsurătorile necesare grupării cromozomilor. Se stabilește lungimea totală a fiecărui cromozom și lungimea brațelor.

— Se fotografiază cele mai bune metafaze sau se fac desene la camera clară.

— Se fac fotocopii. Se recomandă să se fotografieze cel puțin 10% din metafazele studiate.

— Cu ajutorul unei foarfeci se decupează fiecare cromozom și se aranjează pe o foaie de hîrtie albă după criteriile enunțate mai sus. Gruparea se face în perechi de cromozomi omologi, după mărimea lor și poziția centromerului, ce conferă cromozomilor o anumită formă. Cromozomii sînt dispuși în ordinea descrescîndă a lungimii lor. Pentru gruparea cromozomilor omologi, e necesar să se ia în considerare lungimea cromozomilor și raportul brațelor.

Fig. 93. Cromozomi metafizici de A — *Secale cereale* (2n=14); B — *Allium cepa* (2n=16); C — *Triticum aestivum* (2n=42); *Citrullus lanatus* (4n=44).

Grupele morfologice se notează cu cifre sau cu litere mari, în ordine alfabetică. O grupă poate cuprinde, două sau mai multe perechi de cromozomi omologi.

După aranjarea cromozomilor omologi în grupe pe o foaie de hîrtie albă se fotografiază din nou și se obțin fotocopii care reprezintă cariograma speciei respective.

Se recomandă să se elaboreze un sistem unic pentru clasificarea cromozomilor, care să fie acceptat de toți cercetătorii. În prezent se folosesc diferiți termeni pentru același tip de cromozomi. Levan și colab. (1964) au folosit drept criteriu de clasificare a cromozomilor lungimea relativă a brațelor. Potrivit acestui sistem fiecare cromozom poate fi clasificat în una din cele patru grupe : *metacentric* (m), *submetacentric* (sm), subtelocentric (st) și telocentric (t), grupele m și t, includ termenii M și T, pentru cromozomii cu centromerul median și terminal.

Nomenclatura propusă de Levan și colab. (1964) se caracterizează printr-un înalt grad de flexibilitate, cele patru grupe : m, sm, st și t putînd fi combinate în funcție de specia studiată. Astfel este posibil ca înainte de efectuarea măsurătorilor cromozomii să fie clasificați în două grupe msm (m + sm) și stt (st + t).

Un alt avantaj al acestei clasificări este acela că termenii m, sm, st, t pot fi de asemenea folosiți, pentru a desemna poziția centromerilor pe cromozomi, fără a fi implicate regiunile heterocromatice, constricțiile secundare etc. Potrivit nomenclaturii din tabel este posibil să se utilizeze în continuare terminologia : *metacentric, submetacentric, subtelocentric, acrocentric* împreună cu terminologia propusă de Levan fiind stabilită o corespondență între aceste nomenclaturi (fig. 94).

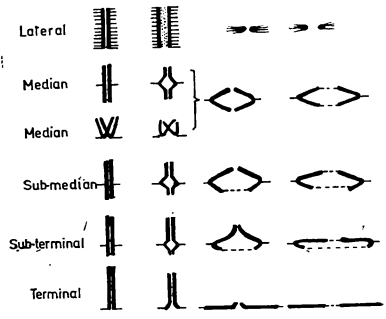


Fig. 94 — Reprezentarea diagramatică a tipurilor morfologice de cromozomi (A. Levan, K. Fredga, A. Sandberg, 1964).

complementului cromozomilor. Astfel, în unele cazuri va putea fi luată în considerație lungimea cromozomilor, care vor fi aranjați în ordine

descrescîndă, în altele va fi mai potrivit să se ia în considerație raportul brațelor, cromozomii fiind :

Poziția centromerului	Raportul brațelor	Cromozomul	
Median în sens strict	1,0	**M**	
Regiunea mediană	1,7	**m**	Metacentric
Submedian	3,0	**sm**	submetacentric
Subterminal	7,0	**st**	subtelocentric
Regiune terminală		**t**	acrocentric
Terminal în sens strict		**T**	telocentric

Se recomandă alcătuirea cariotipului la speciile care au un număr redus de cromozomi : *Vicia faba, Allium cepa, Secale cereale, Hordeum vulgare, Aloë barbadense* ș.a. (tabelul 16).

Tabelul nr. 16

Numărul haploid de cromozomi de la diferite plante

Specia	Numărul haploid de cromozomi	Specia	Numărul haploid de cromozomi
Allium cepa	8	Neurospora crassa	7
Allium fistulosum	8	Oenothera lamarkiana	7
Arabidopsis thaliana	5	Oryza sativa	12
Asparagus officinalis	10	Ornithogalis virens	3
Bellis perenis	9	Paeonia tenuifolia	5
Brassica oleracea	9	Pelargonium zonale	9
Beta vulgaris	9	Petunia hybrida	7
Cannabis sativa	10	Phaseolus vulgaris	11
Capsicum annum	12	Piper nigrum	64
Citrullus lanatus	11	Pisum sativum	7
Crepis capilaris	3	Plantago otava	4
Cucumis sativus	7	Raphanus sativus	8
Datura stramonium	12	Ribes nigrum	8
Daucus carota	9	Ricinus communis	10
Fragaria vesca	7	Schizaea robusta	96
Fragaria virgiana	28	Schizaea dichotoma	540
Gadium grande	110	Secale cereale	7
Haplopappus gracillis	2	Spinacea oleracea	6
Hordeum vulgare	7	Tradescantia paludosa	6
Iris germanica	11	Trifolium grandiflorum	5
Lactuca sativa	9	Trifolium pratense	7
Luzula purpurea	3	Triticum durum	14
Linum grandiflorum	8	Triticum aestivum	21
Lolium perene	7	Tulipa gesneriana	12
Lycopersicum esculentum	12	Vicia faba	6
Mentha piperitha	17	Vicia sativa	6
Morus alba	14	Zea mays	10

Pentru exemplificare prezentăm cariotipul la *Allium cepa, Aloë barbadense* și *Secale cereale,* cu mențiunea că în literatura de specialitate există controverse în privința lungimii cromozomilor și raportul brațelor, datorită diferitelor metode folosite.

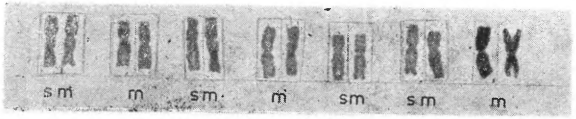
10.3.1. CARIOTIPUL LA SECALE CEREALE

Cromozomii de la *Secale cereale* se grupează astfel :

Cromozomii din perechile I și III au centromerul submedian ;

Cromozomii din perechile II, IV și VII au centromerul median. Cromozomii VII au satelit și sînt cei mai scurți ;

Cromozomii V și VI prezintă centromerul subterminal. În privința dimensiunilor cromozomilor, datele sînt contradictorii, fiind dependente de tehnicile utilizate pentru efectuarea preparatelor (fig. 95).



10.3.2. CARIOTIPUL LA ALLIUM CEPA

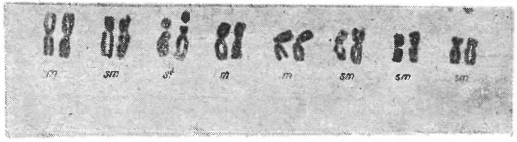
Perechea I de cromozomi are centromerul subterminal și o constricție secundară pe brațul stîng.

Perechea 2 — cuprinde cromozomi submetacentrici, fiind cea mai mică pereche de cromozomi.

Perechea 3 și 4 de cromozomi au centromerul aproape median.

Perechea 5 are centromerul median și este cea mai mare pereche de cromozomi.

Perechile 6, 7 și 8 de cromozomi au centromerul submedian, fiind aranjați în ordine descrescătoare (fig. 96).

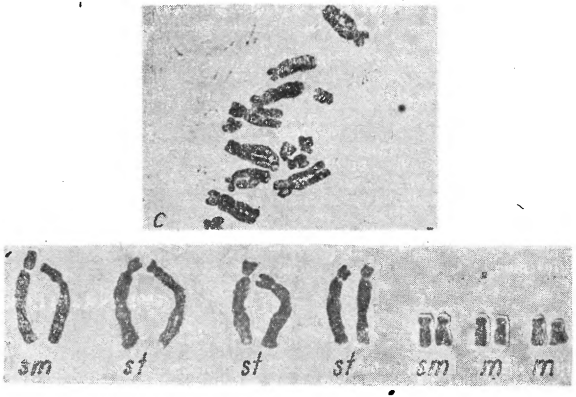


Lungimea brațelor la cromozomii mitotici din metafaza colchicinizată de Allium cepa (după Lima De Faria și colab., 1962 — citat după P. Raicu și colab., 1973)

Nr. cromozomului	Media lungimii brațelor	
	brațul lung	brațul scurt
1	5,8	2,3
2	3,8	2,3
3	4,3	3,4
4	3,6	3,9
5	5,1	4,7
6	5,9	3,5
7	5,5	3,8
8	5,0	3,4

10.3.3. CARIOTIPUL LA ALOË BARBADENSE

Majoritatea taxonilor aparținînd acestui gen sînt diploizi și au o constituție cromozomală extrem de uniformă : 2n = 2x = 14. *Aloë barbadense* nu face excepție prezentînd un complement cromozomal bimodal, formați din 8 cromozomi lungi și 6 scurți. Cele patru tipuri morfologice ale cromozomilor lungi au fost notate cu **L1, L2, L3 și L4**, iar cele ale cromozomilor scurți cu S1, S2 și S3. Folosind metoda lui A d n i k a r y (1974), pentru determinarea poziției centromerului, rezultă următoarele detalii cariomorfologice : L1 = submetacentric, L2, L3 și L4 = subtelocentric, S1 = submetacentric, iar S2 și S3 = metacentric (fig. 97).



10.4. METODE PENTRU DETERMINAREA DURATEI CICLULUI MITOTIC

Diviziunea mitotică este un proces complex în timpul căruia nucleul parcurge o serie de faze succesive pe durata cărora au loc transformări morfologice și biochimice, în urma cărora rezultă doi nuclei-fii și respectiv, două celule-fiice, cu același număr de cromozomi ca și celula mamă. Diviziunea mitotică se desfășoară continuu, fiind diferențiați în mod convențional în patru faze : profaza, metafaza, anafaza, telofaza, cu numeroase stadii de tranziție, în timpul cărora au loc transformări caracteristice. Interfaza, intervalul de timp care separă două diviziuni succesive ale unei diviziuni, reprezintă o etapă esențială a activității celulare, în care au loc importante reacții metabolice și un intens transfer

de material și energie între nucleu și citoplasmă, grupate în trei perioade (etape) : perioada *presintetică* (G_1), *perioada de sinteză* (S) și *perioada postsintetică* (G_2) (fig. 98, 99).

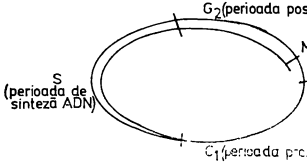


Fig. 98 — Diagrama ciclului mitotic.

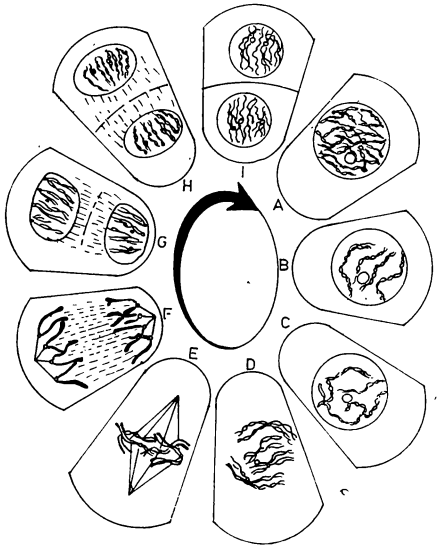


Fig. 99. Fazele ciclului mitotic. A—D — profaza, E — metafaza, F — anafaza, G — H — telofaza ; I — interfaza.

Perioada presintetică (G_1) se caracterizează prin absența procesului de sinteză și existența unei cantități de ADN care corespunde stadiului de două cromatide (2C). Unele celule intră în G_1 cu cromozomi monocromatidici. În celulele care se divid rapid perioada presintetică este foarte scurtă sau lipsește, în timp ce în altele este foarte lungă. Dintre stadiile interfazei, perioada G_1 este cea mai variabilă în timp ce ocupă 25—50% din durata interfazei. Unele celule pot fi într-o permanentă perioadă G_1 în timp ce altele, în perioada G_1 se desfășoară procese specifice — organizarea substratului și sinteza enzimelor necesare replicării ADN.

Perioada de sinteză (S) — se caracterizează prin dublarea substanțelor și structurilor înjumătățite prin diviziunea celulară precedentă. Reacțiile metabolice au loc atît în nucleu cît și în citoplasmă și constau în principal în „reproducerea" (replicarea) ADN, histonelor și a macromoleculelor proteice din compoziția aparatului acromatic. În interfază are loc sinteza și a altor compuși citoplasmatici și nucleari : ARN, proteine, molecule precursoare ale peretelui despărțitor și se eliberează energia necesară desfășurării proceselor propriu-zise. Perioada S are o durată relativ constantă pentru un anumit tip de celule și specii și reprezintă 35—40% din durata interfazei.

Perioada postsintetică (G_2) se caracterizează prin creșterea volumului nucleului. În G_2 au loc transformări metabolice necesare mitozei.

La microscopul fotonic fiecare cromozom se prezintă sub forma unei singure cromatide în G_1 și constituit din două cromatide în G_2. În mod frecvent, cromozomii de la numeroase specii de plante și animale superioare sînt constituiți din două sau mai multe cromatide, înainte de duplicare și patru sau mai multe cromatide după duplicare. Deoarece cantitatea de ADN se dublează în perioada S, nucleul are valoarea 2C înaintea procesului de sinteză și 4C după sinteza ADN.

Durata ciclului mitotic este dependent de specie, tipul celulei, mediul de cultură și o serie de factori externi, dintre care temperatura este mai important.

10.4.1. METODA OBȚINERII UNEI POPULAȚII SINCRONE DE CELULE TETRAPLOIDE

Pentru determinarea duratei mitozei și a interfazei, țesutul meristematic din vîrful radicelei sau lăstarilor este iradiat sau tratat cu colchicină. Prin iradiere cu raze X are loc blocarea diviziunii celulare. Se consideră că prin stabilirea timpului în care dispar toate mitozele se poate determina durata mitozei.

Colchicina blochează diviziunea celulară în metafază Epifanova (1965), apreciază că numărul de diviziuni blocate în metafază (MLkx) este proporțional cu indicele mitotic și cu timpul de acțiune al colchicinei (N) și invers proporțional cu durata mitozei (tM).

$$MIkx = \frac{MtIA}{tM} \qquad tM = \frac{MIkx}{MIA}$$

Indicele mitotic reprezintă raportul dintre numărul celulelor care se divid și numărul total de celule din țesutul studiat. Se poate deter-

mina prin mai multe procedee. Se efectuează preparate semipermanente sau permanente de tip squash, folosind metoda de colorare Feulgen și se calculează numărul de celule în diviziune pe unitatea de suprafață sau se calculează numărul de mitoze la o mie de celule din țesut. Indicele mitotic se exprimă în procente.

Durata interfazei poate fi determinată pornind de la durata mitozei și cunoscînd numărul total de celule din țesut. S-a stabilit că raportul dintre numărul mitozelor (M) și numărul celulelor în repaos (N) este egal cu raportul dintre durata mitozei (tM) și durata interfazei (T).

$$\frac{n}{N} \cdot \frac{tM}{T} \quad T = \frac{tMN}{n}$$

Pentru determinarea duratei ciclului mitotic se recomandă să se folosească speciile : ***Crepis capillaris, Allium cepa, Vicia faba, Hordeum vulgare, Secale cereale***. Semințele se pun la germinare în vase Petri, pe hîrtie de filtru îmbibată cu apă de robinet, iar bulbii de ceapă se plasează deasupra unui pahar Erlenmayer, umplut cu apă de robinet, în așa fel ca discul (tulpina adevărată) să se scufunde în apă. În momentul în care radicelele embrionare au 2—3 mm lungime, semințele se transferă în alte vase Petri, pe hîrtie de filtru îmbibată cu colchicină 0,05% sau în vase Petri care conțin soluție de colchicină 0,05% și se introduc în termostat, la temperatura de 25° C. Din 2 în 2 ore se recoltează un anumit număr de radicele, timp de cel puțin 24—48 ore și se prelucrează după metoda Feulgen. În felul acesta se realizează un tratament continuu cu colchicină care după un anumit timp determină apariția celulelor tetraploide. Pentru determinarea populațiilor de celule tetraploide se fac preparate de tip squash și se identifică celulele tetraploide ce se găsesc în metafază. Frecvența celulelor tetrapoide se determină cu ajutorul indexului poliploid care reprezintă numărul de celule tetrapoide la 1000 de celule. Se calculează numărul de celule tetrapoide rezultate sub acțiunea colchicinei și timpul în care s-au transformat și se reprezintă grafic.

S-a stabilit că timpul mediu între două maxime succesive ale indexului poliploid reprezintă durata ciclului mitotic.

Deoarece se consideră că sincronismul populației de celule tetraploide se menține numai în cursul a 3—4 cicluri mitotice, pentru obținerea unor rezultate precise se recomandă folosirea numai a primelor două diviziuni mitotice de la apariția celulelor tetraploide.

10.4.2. METODA MICROAUTORADIOGRAFIEI CU TIMIDINĂ MARCATĂ CU ^3H

Metoda se bazează pe faptul că timidina fiind precursor al timinei poate fi încorporată direct în macromolecula ADN, în perioada de sinteză. Pentru determinarea duratei ciclului mitotic cu ajutorul acestei metode se procedează în felul următor. Semințele sau bulbii se pun la germinat în vase Petri sau Erlenmayerre, în apă, la temperatura constantă. După germinare se transferă în soluție nutritivă în care se introduc timidina tritiată H. Concentrația soluției de timidină tritiată poate fi μ C/ml. Durata tratamentului este de 15—30 minute.

După tratament se recoltează radicele, din oră în oră, cel puțin 24 ore și se prelucrează după metoda Feulgen. Se fac preparate de tip squash. Autoradiografiile se efectuează la întuneric și se folosesc filme sau emulsie specială. Pentru impresionarea filmului sau emulsiei, materialul se păstrează 3—4 săptămîni la întuneric, la temperatura de 2—4°C. Pentru acumularea unui număr mare de metafaze în țesutul meristematic înainte de fixare se poate efectua un pretratament cu colchicină 0,01%, timp de o oră.

În preparatele microscopice se urmărește momentul apariției celulelor marcate. Primele mitoze în care cromozomii sînt marcați cu timidină tritiată sînt localizați în celulele care în momentul marcării cu 3H se aflau la sfîrșitul perioadei de sinteză a ADN. Perioada de sinteză a ADN(S) cuprinde timpul din momentul apariției primelor mitoze marcate pînă în momentul creșterii procentului de mitoze nemarcate.

Perioada postsintetică G_2 este considerată intervalul de timp de la administrarea ^3H pînă la marcarea a 50% din celulele în diviziune. Treptat procentul metafazelor marcate va crește pînă la un punct, după care va începe să scadă. Încheind tot ciclul, celulele se divid din nou. Perioada de timp între două maxime ale mitozelor marcate corespunde cu durata ciclului mitotic (T).

11. TEHNICI DE INDUCERE ŞI IDENTIFICARE A POLIPLOIZILOR

11.1. INTRODUCERE

Cercetările efectuate în ultimul timp au demonstrat rolul important al poliploidiei (autoploidiei, aneuploidiei şi amfidiploidiei) în procesul de speciaţie, de evoluţie a vieţuitoarelor determinînd un proces de recombinare genetică şi respectiv un transfer de gene de la o specie la alta. Cu mici excepţii, poliploidia este răspîndită în tot regnul vegetal. Astfel, G. L. Stebbins (1950), pe baza cercetărilor întreprinse, afirmă că circa 35% din totalul speciilor de plante existente în natură sînt poliploide. La Angiosperme, acest procent este mai mare şi reprezintă 30—35% faţă de cel al gimnospermelor, care este de numai 4,6%. Dintre gimnosperme sînt cunoscuţi ca fiind poliploizi reprezentanţii din familiile : *Pinaceae, Taxodiaceae, Cupressacea* etc. La angiosperme frecvenţa poliploidiei este mult mai înaltă, în special la familiile : *Gramineae, Polygonaceae, Grassulaceae, Rosaceae Valvaceae, Iridiaceae,* la care există numeroase specii şi genuri poliploide, care uneori alcătuiesc sării poliploide. Poliploidia este foarte răspîndită în special în regiunile cu climat mai aspru : regiuni nordice, montane, deşerturi. Un procent ridicat de specii poliploide se întîlneşte în flora Saharei, în regiunile de ţărm ale Japonici, unde se întîlnesc variaţii mari de temperatură, în regiunile sărăturoase etc.

Este interesant de remarcat că procentul de apariţie al autopoliploidiei este mai intens la plantele cultivate, deoarece acestea sînt puse în condiţii foarte variate de mediu, fapt care măreşte posibilitatea de apariţie a plantelor poliploide. De exemplu, în Pamir datorită condiţiilor aspre de climă, în care este cultivat cartoful, au apărut numeroase forme noi poliploide (A. Baranov şi S. H. Bukasov, 1954). Din specia *Solanum vallis mexici* a apărut o formă hexaploidă care a fost denumită *Solanum vallis mexici poliploideum* (R. L. Perlova, 1944). S-au obţinut de asemenea forme poliploide la speciile *Solanum tenuifilamentum, Solanum mammilliferum, Solanum cuencanum.*

La narcise pînă la anul 1885 erau cunoscute numai forme diploide (2n = 24), cu flori mici. Acestea au fost apoi înlocuite cu forme triploide (2n=26) cu flori mai mari ; iar la sfîrşitul secolului XIX au apărut forme tetraploide (2n = 48), ce formează flori mult mai mari

(Narcisus poeticus, Narcisus pseudonarcisus). La lalele se cultivă de circa 4 secole forme triploide, cu flori mult mai mari decît a celor diploide și mai intens colorate.

Încă de multă vreme au fost selecționate de om și introduse în cultură, datorită calităților lor deosebite, forme poliploide de plante, apărute în mod natural (G. L. Stebbins, 1950): *cartorul (Solanum tuberosum* 2n = 48); *lucerna (Medicago sativa,* 2n = 32); *cartoful dulce (Ipomoea batatus,* 2n=90), *Alunele de pămînt (Arachis hypogea,* 2n = 40); *arborele de cafea (Coffea arabica,* 2n = 22, 44, 66, 88).

O. Winge (1917) și A. Müntzing (1930) studiind modul de apariție a unor specii au emis ipoteza că multe specii au apărut printr-un proces complex de hibridare interspecifică și poliploidie. Astfel, între speciile de plante cultivate, o parte însemnată sînt la origine alloploizi (G. L. Stebbins, 1950): *tutunul (Nicotiana tabacum,* 2n = 48); *bumbacul (Gossypium hirsutum,* 2n = 52), *grîul comun (Triticum aestivum,* 2n = 42), *ovăzul (Avena sativa,* 2n = 42), *trestia de zahăr (Saccharum officinarum,* 2n = 80), *prunul (Prunus species,* 2n=16, 24, 32, 48), *murul (Rubus loganobaccus,* 2n = 42), *fragul (Fragaria grandiflora,* 2n = 56) etc. Această ipoteză a fost confirmată experimental, dovedindu-se că multe specii cultivate sînt la origine amfidiploide, putînd fi resintetizate artificial prin încrucișarea genitorilor.

În cultură sînt cunoscute de asemenea cîteva forme triploide care formează fructe comestibile, practic fără sîmînță și de calitate superioară, cum sînt: *bananierul (Musa sapientium,* 3n = 75), *vița de vie (Vitis vinifera* 3n = 57), *dudul (Morus alba,* 3n = 42) etc. Aceste forme triploide au apărut pe cale naturală și au fost selecționate de om pentru calitățile lor. La plop au apărut forme triploide (3n = 57) care se caracterizează printr-o creștere luxuriantă și rapidă, datorită fenomenului de heterozis și care au început să fie extinse în cultură.

Pe baza studiilor întreprinse pentru descifrarea cauzelor naturale care proovacă poliploidia la plante, în ultimele decenii au fost elaborate diferite metode de obținere a ploiploizilor pe cale artificială. Printre aceste metode amintim:

— *metoda centrifugării (D. Kostoff* 1937), *regenerației* (H. Winkler, 1916 și C. A. Joergensen, 1928), *șocurile de temperatură* (L. F. Randolph, 1932), *poliembrioniei* (A. Müntzing, 1958), *iradierii cu radiații ionizante, metoda tratării cu substanțe chimice.* Descoperirea în 1937 de către A. F. Blakelee și A. G. Avery a efectului poliploidizant al colchicinei asupra plantelor a deschis noi perspective de obținere experimentală a poliploizilor.

Datorită faptului că plantele poliploide posedă caractere și însușiri valoroase, cu importanță practică, în ultima vreme au fost create numeroase soiuri și linii poliploide la diferite plante de cultură. În primul rînd subliniem faptul că cercetările întreprinse au evidențiat faptul că anumite tipuri de plante se pretează mai bine pentru poliploidizare și anume:

— plantele care prezintă în mod natural un număr relativ redus de cromozomi;

— plantele alogame pot fi mai ușor poliploidizate decît cele autogame, datorită gradului mai mare al heterozigoției;

— plantele cultivate pentru organele lor vegetative : frunze, rădăcini, tulpini, flori, dau mai bune rezultatele prin poliploidizare decît cele cultivate pentru semințe.

Studiile întreprinse pentru obținerea artificială a poliploizilor au arătat că plantele cu același număr de cromozomi reacționează diferit la poliploidizare. De exemplu, plantele cu o structură celulară inferioară reacționează mai puternic la poliploidizare decît cele cu o structură complicată (L. M. Tobler, 1960). La inul de ulei de exemplu, poliploidia este corelată cu înălțimea plantelor, în timp ce la inul de fuior această creștere este neînsemnată sau lipsește, în schimb crește greutatea semințelor, lucru ce nu se întîlnește la inul de ulei. Această reacție deosebită se datorește faptului că inul de ulei ce provine din Orientul mijlociu, datorită selecției naturale și artificiale, s-a adaptat la o tulpină scurtă, neacumulîndu-se genele pentru lujerul lung. În cazul inului de fuior chiar la nivelul diploidiei s-au acumulat genele favorabile lungimii lujerului, iar dublarea numărului de cromozomi, ce se realizează prin poliploidizare, are o influență mică asupra lungimii lujerului. Aceeași influență se întîlnește și în cazul dimensiunilor semințelor. Ca rezultat al selecției, plantele originale din Orient și-au menținut genele favorabile, în timp ce la cele din nord nu s-au acumulat aceste gene. Reacția la poliploidie este inversă în cazul relației înălțimea plantei-greutatea seminței. Reacții diferite la poliploidie se întîlnesc și la alte specii : *Ribes nigrum* (Vaarama A., 1912), *tomate* (Bohn G. W., Nilson F., 1939).

În transformarea plantelor sălbatice în plante cultivate, o etapă hotărîtoare o reprezintă creșterea volumului celulei, indiferent dacă este determinată de o genă sau de dublarea numărului de cromozomi, ori de creșterea volumului cromozomilor. Schwanitz F. (1951), presupune că poliploizii naturali provin de la formele primitive cu o structură celulară simplă care încă nu au ajuns la un volum optim, în timp ce majoritatea poliploizilor obținuți experimental derivă de la forme care deja au atins un volum optim al celulei (H. Douwes, 1946 : Geitler, 1940 ; Michaelis P., 1949 ; Schwanitz F., 1940) influențînd nefavorabil fertilitatea plantelor. Spre exemplu, *L. pimpinellifolium* și *L. raccemiflorum*, specii tetraploide sălbatice, formează fructe mari și multe semințe în timp ce *L. aesculentum*, tetraploid artificial, prezintă un înalt grad de sterilitate (Shimanura T., 1938 ; Quadt F., 1949).

Din aceste considerente se apreciază că formele sălbatice și cele recent introduse în cultură, cu structură celulară simplă constituie un material favorabil pentru inducerea artificială a poliploidiei, decît formele vechi, cultivate la care fenomenul de gigantism a atins deja expresia maximă.

11.2. TEHNICI DE INDUCERE A POLIPLOIDIEI

Cele mai bune rezultate în inducerea experimentală a poliploidiei s-au obținut prin tratarea semințelor, mugurilor, inflorescențelor sau plantulelor cu colchicină.

Colchicina ($C_{22}H_{25}$ NO_6) este un alcaloid care se găsește în natură, în bulbii de brîndușă de toamnă (*Colchicum autumnale* 2n = 38) din care s-a extras, în scopuri medicale, din cele mai vechi timpuri. În prezent datorită folosirii colchicinei pe scară largă în biologie, agricultură, medicină, iar extragerea din brîndușa de toamnă este costisitoare, fiind în cantitate redusă (0,5% în bulbi, 0,5—1% în semințe, 0,805—0,810% în flori), se obține pe cale sintetică. Deoarece colchicina, care este o substanță foarte solubilă în apă, se degradează la lumină și căldură, se recomandă să se pregătească în cantități reduse și să fie păstrată în sticle colorate și la frigider.

Colchicina fiind o substanță toxică (din punct de vedere chimic este un derivat aminat și metaxilat al fenantrenului), provoacă o hipertrofie a țesutului tratat și care este cu atît mai puternică cu cît în țesutul respectiv se găsesc mai multe celule în diviziune. Aceasta se datorește faptului că acțiunea toxică a colchicinei se exercită în special asupra fusului nuclear. Datorită acestei acțiuni diviziunea celulară capătă un aspect caracteristic denumit C-mitoză și respectiv C-meioză.

Acțiunea nocivă a colchicinei se exercită asupra structurii microscopice și submicroscopice a fibrelor fusului nuclear provocînd o dezorganizare a acestora și o inhibare a formării fusului de diviziune celulară. Citoplasma devine mai fluidă, iar cromozomii se contractă și se împrăștie în întreaga celulă, fără a mai forma placa ecuatorială, avînd de-a face cu o *pseudometafază*. Brațele cromatidelor fiecărui cromozom capătă aspectul literei X, rămînînd prinse în regiunea centromerului. Urmează separarea cromozomilor și în regiunea centromerului și se dispun paralel, sub forma unei perechi de schiuri (A. Levan, 1938). Procesul de diferențiere a cromozomilor continuă, astfel că cele două cromatide ale fiecărui cromozom devin cromozomi independenți iar în urma desfășurării pseudoanafazei și pseudotelofazei, se formează nucleul de restituție, în interiorul celulei inițiale. În constituția acestui nucleu de restituție intră astfel un număr dublu de cromozomi față de celula supusă acțiunii colchicinei, luînd naștere o celulă tetrapoidă.

Pentru obținerea plantelor poliploide cu ajutorul colchicinei se folosesc diferite metode de tratament, ce se stabilesc în funcție de specie, stadiu de creștere al plantei în care se efectuează tratamentul, concentrația colchicinei.

Astfel se pot trata semințe negerminate, semințe germinate, plantule tinere, muguri, ramuri, inflorescențe. Tratamentul se efectuează prin imersionarea semințelor, a vîrfului de creștere sau a inflorescenței în soluție apoasă de colchicină, depunerea soluției de colchicină pe vîrful de creștere, prin pipetare, timp de mai multe ore sau chiar zile etc. Pentru a împiedica evaporarea soluției de colchicină și deci pentru a prelungi timpul de acțiune asupra celulelor, în soluția apoasă se adaugă o mică cantitate de agar-agar, glicerină sau soluția de colchicină se depune pe un tampon de vată ce se plasează pe vîrful de creștere al plantei.

Pe baza observațiilor efectuate cu privire la durata ciclului mitotic se recomandă ca tratamentul să fie efectuat dimineața între orele 7—8,30 sau seara între orele 20,00—20,30 cînd se înregistrează o frecvență

mărită a diviziunilor celulare și în același timp intensificarea evaporării este mai redusă.

Materialul biologic supus tratamentului reacționează diferit la acțiunea colchicinei. O parte din plantele tratate mor datorită acțiunii toxice a colchicinei, o altă parte reacționează parțial, devenind mixoploide, ce prezintă țesuturi formate din celule diploide și celule tetraploide, în proporții diferite, un număr relativ redus de plante tratate cu colchicină devine tetraploide.

Datorită calităților și însușriilor valoroase pe care le prezintă plantele poliploide, în ultima vreme au fost create pe cale experimentală numeroase soiuri și linii poliploide, la diferite plante de cultură.

CEREALE. *Secale cereale* (secară); *Triticum sp.* (grîul), *Hordeum vulgare* (orzul), *Oryza sativa* (orezul); *Zea mays* (porumbul) etc.

LEGUME. *Raphanus sativus* (ridichi de lună); *Spinacea oleracea* (spanacul); *Solanum esculentum* (roșiile); *Brassica rapa rapifera* (rapița); *Citrullus vulgaris* (pepenele verde) *Cicer arietinum* (năutul); *Fragopyrum esculentum* (hrișca) etc.

PLANTE ORNAMENTALE: *Ageratum mexicanum, Chrisanthenum coronarium* (crizantema), *Lilium grandiflorum* (crinul); *Antirrhinum majus* (gura leului) etc.

PLANTE FURAJERE: *Medicago sativa* (lucerna); *Trifolium pratense* (trifoiul); *Dactylis glomerata* (golomățul); *Lolium perene* (raigras englezesc), *Beta vulgaris ssp. oltissima* (sfecla de zahăr), *Beta vulgaris* (sfecla furajeră).

PLANTE INDUSTRIALE ȘI MEDICINALE: *Linum usitatissimum* (inul), *Gossypium hirsutum* (bumbacul), *Nicotiana tabacum* (tutunul), *N. rustica* (tutun), *Datura stramonium* (ciumăfaia), *Mentha piperita* (isma).

ARBORI ȘI ARBUȘTI FRUCTIFERI: *Morus alba* (dudul), *Pirus domestica* (mărul) etc.

Prezentăm orientativ o serie de metode de tratament cu colchicină pentru obținerea plantelor poliploide, la principalele plante de cultură ce au fost introduse deja în cultură sau care prezintă interes pentru folosirea poliploidiei în ameliorarea lor.

CEREALE.

Secale cereale (secara) 2n = 14). Cele mai bune rezultate s-au obținut prin folosirea metodei preconizată de D. E. Bremer-Reinders și G. Bremer (1952). Semințele germinate pe hîrtie de filtru, în vase Petri, sînt imersionate în soluție de colchicină 0,2% timp de 2 ore. Elliot C. și M. Bragdö (1955) au folosit următoarea metodă. Semințele au fost puse la germinat pe hîrtie de filtru sau în ghivece cu nisip. După germinare, cînd coleoptilele au 0,5—1 cm se scufundă în soluție de colchicină 0,25% timp de 30 minute. Pentru aceasta plantele se introduc cu coleoptilele în soluția de colchicină ce se găsește într-un vas sau capsulă de cîntărire, iar radicelele se fixează în sus, fiind introduse prin ochiurile unui carton ce se sprijină pe marginile vasului cu colchicină. Pentru a împiedica uscarea radicelelor, acestea se acoperă cu vată îmbibată cu apă sau hîrtie de filtru umedă.

Prin imersionarea în soluție apoasă de colchicină 0,1% timp de 3 ore, a 1400 semințe germinate Alex. Constantinescu-Mi-

hăilescu (1969) au obținut 6 plante tetraploide și 2 plante mixoploide.

Triticum sp. (grîul) 2n = 14. Pentru obținerea formelor poliploide, în special la speciile diploide (*T. monoccocum*) se pot folosi aceleași metode ce au fost prezentate pentru *Secale cereale*. E. Dorsey (1939), a tratat semințe germinate prin imersionarea acestora într-o soluție de colchicină 0,25% timp de 30 minute.

Hordeum vulgare (orzul) 2n = 14. Semințele se pun la germinat pe hîrtie de filtru în vase Petri. După germinare, cînd coleoptilul are 1—3 mm, se imersionează în soluție de colchicină în concentrație de 0,1—0,3%, un timp ce variază de la 30 minute — 48 ore. Această metodă se folosește și pentru obținerea poliploizilor de *Hordeum vulgare*. Prin utilizarea acestei metode A. Constantinescu-Mihăilescu, din 156 semințe germinate ce au supraviețuit tratamentului, au obținut 12 plante autotetraploide și mixoploide, ce prezintă pe aceeași tufă frați diploizi și tetraploizi.

Avena brevis (ovăzul) 2n = 14. Semințele germinate cu coleotipul de 3—6 mm se imersionează în soluție apoasă de colchicină 0,25% timp de 30 minute.

Oryza sativa (orezul) 2n = 24. Semințele de orez se pun la germinat pe hîrtie de filtru în vase Petri avînd asigurate condițiile de temperatură, umiditate și lumină cerute de agrotehnica acestei plante. După germinare semințele se imersionează în soluței de colchicină 0,2% timp de 6—12 ore.

Zea mays (porumbul) 2n = 20. Primele încercări de obținere experimentală a poliploizilor la porumb au fost efectuate de L. Randolph (1932) prin metoda șocurilor de temperatură. Se izolează inflorescențe femele și mascule și după efectuarea polenizării, plantele se țin la o temperatură de 43—45°, pentru 24 ore. Temperatura acționează asupra primelor diviziuni mitotice, determinînd apariția plantelor poliploide.

P. Diaconu și S. Cîrstea (1967) au obținut plante tetraploide prin metoda decapitării coleoptilului sau prin imersionarea coleoptilului în soluție de colchicină.

Y. Sumnîi (1965) a tratat semințe îmbibate cu apă, cu soluție de colchicină 0,2% timp de 18—24 ore. Rezultate superioare s-au obținut prin secționarea coleoptilului și tamponarea secțiunii cu vată îmbibată cu soluție de colchicină 0,1—0,2%.

Rezultate interesante au obținut M. N. Nvatova (1967), B. F. Iudin și D. F. Petrov și colab. (1967).

Metode pentru obținerea amfidiploizilor de tip triticale. Semințele hibride (Fo) obținute prin încrucișarea diferitelor specii sau plante hibride din F_1 se tratează cu colchicină, pentru dublarea numărului de cromozomi și refacerea astfel a fertilității plantelor ce lipsește la hibrizi. Metodele de tratament cu colchicină sînt asemănătoare cu cele ce se folosesc pentru obținerea plantelor autotetraploide.

— Semințele hibride obținute din încrucișarea diferitelor specii de *Triticum* și *Secale cereale*, se însămînțează în cîmpul de experiențe. În perioada de înfrățire se secționează 1—2 frați, iar secțiunea se introduce într-o eprubetă cu soluție de colchicină 0,2—0,3% timp de 24—

72 ore. Soluția de colchicină difuzează în întreaga plantă, determinînd dublarea numărului de cromozomi (Metoda G. Bell, 1950).

— Semințele hibride din Fo se pun la germinat pe hîrtie de filtru sau în ghivece cu nisip. După germinare, coleoptilul este imersionat în colchicină, soluție 0,05% timp de 24—72 ore sau în soluție apoasă de colchicină 0,25% timp de 30 minute.

Metoda Sears. Tratamentul se efectuează în perioada de înfrățire, prin tamponarea nodului de înfrățire cu vată îmbibată în soluție de colchicină 0,5% timp de 5 zile; sau prin introducerea vîrfului de creștere în soluție de colchicină 0,3% timp de 72 ore.

Metoda Jebrak. Semințele hibride din Fo se scufundă într-o soluție de colchicină 0,1% timp de 24 ore. Prin încrucișarea diferitelor specii de *Triticum (T. aestivum, T. Timopheevi, T. durum)* și tratarea semințelor hibride din Fo, Jebrak a obținut numeroși amfidiploizi, mărind astfel seria poliploidă a grîului prin obținerea unor forme octoploide și decaploide.

— Semințele germinate, cu coleotipul de cca. 10—15 mm se imersionează în soluței de colchicină 0,2% timp de 5—50 minute (F. Petö și G. A. Young, 1942).

— Plantele hibride, înainte de înfrățire se secționează de la suprafața solului și se acoperă cu o capsulă de gelatină umplută cu o soluție de colchicină 0,1—0,4%. Se folosește pentru obținerea amfidiploizilor la *Triticum* și *Agropyrum.*

Carderony și Saigne (1966) au obținut 19 forme noi de triticale prin aplicarea pe coleoptil a unui tampon de vată îmbibat în soluție de colchicină 0,4% timp de 48 ore. Astfel, din 93 de plantule tratate, 31 au dat în descendență amfidiploizi.

Pentru obținerea unor rezultate pozitive în acțiunea de producere a unor amfidiploizi de tip triticale, A. Müntzing (19511) recomandă realizarea următoarelor etape :

— încrucișarea între plante hibride din F_1 și selecția amfidiploizilor în generațiile următoare ;

— tratarea cu colchicină a hibrizilor din F_1, urmată de încrucișarea amfidiploizilor obținuți ;

— retroîncrucișarea între plantele de Triticale și *T. aestivum,* pentru a se obține amfidiploizi cu pronunțate caractere de grîu ;

— polenizarea plantelor hibride din F_1 cu polen de triticale pentru a obține tipuri noi de amfidiploizi.

Pentru obținerea amfidiploizilor din genul *Cucurbita,* O. N. Pearson, R. Hopp și G. V. Bohn (1951) au elaborat următoarea metodă : semințele hibride ce se obțin prin încrucișarea diferitelor specii din genul *Cucurbita* sînt puse la germinat, mai întîi la întuneric pentru creșterea hipocotilului, iar apoi sînt trecute la lumină timp de 2 zile, pentru obținerea plantulelor cu cotiledoanele desfăcute.

Plantele în stare cotiledonară sînt imersionate cu virful de creștere în soluție de colchicină 0,4% timp de 48 ore.

LEGUME

Raphanus sativus (ridichi de lună) 2n = 18. Semințele se însămînțează direct în cîmp. Se tratează plantele în stare cotiledonară, prin pipetare pe vîrful de creștere a unei picături de soluție apoasă de colchicină 1% timp de 3 zile, de 2 ori pe zi, în soluția de colchicină s-a adăugat agar-agar 0,3% (Constanța Popescu, 1969). Tabelul nr. 17.

Tabelul nr. 17

Rezultatele tratamentului cu colchicina a plantelor dipoide (C. Popescu, 1969)

Soiul	Plante tratate	Plante ce au supraviețuit	Plante 4n	
			nr.	%
Roșie cu vîrful alb	119	45	13	28,9
Albă rotundă	140	50	22	44,0

Capsicum annuum (ardeiul) 2n = 24.

Se tratează vîrful de creștere cu soluție apoasă de colchicină 0,5 și 0,9%. Prin acest procedeu, din 70 plante tratate au rezultat 2 plante autotetraploide.

Liuba Kisimova (1969) a tratat vîrful de creștere cu o soluție de colchicină 0,2%. Tratamentul a fost repetat de 5 ori pe zi, timp de 6 zile consecutiv.

Citrullus vulgaris (pepenele verde) (I. Anghel 1963, după H. Kihara).

Plantele tetraploide (4n = 44) se obțin prin tratarea cu soluții apoase de colchicină în concentrație de 0,4% a unor plante tinere diploide (2n = 22), în stare cotiledonară. Pe baza observațiilor efectuate în perioada 1963—1967 cu privire la intensitatea diviziunii celulare din țesutul meristematic se recomandă ca tratamentul cu colchicină să se efectueze între orele 7,30—8,30.

Semințele diploide se seamănă în ghivece nutritive, confecționate cu ajutorul mașinii, din pămînt, mraniță și nisip, sau tăiate din pămînt de țelină. Se pot folosi de asemenea ghivece din cartor, placaj sau pămînt ars, umplute cu un amestec în care intră pămînt de grădină, mraniță sau turbă și nisip. Pentru a avea condiții optime de temperatură, umiditate și aerisire necesare în perioada de germinare a semințelor, ghivecele sînt ținute în sere sau în răsadnițe încălzite natural sau artificial (cu abur sau curent electric). Tratamentul cu colchicină se efectuează imediat ce semințele au germinat și durează 4—6 zile pentru fiecare plantă. Tratamentul se efectuează prin pieptare în fiecare zi la aceeași oră și cu aceeași cantitate de soluție pentru fiecare plantă.

Pentru ca soluția de colchicină să se mențină mai mult timp pe vîrful de creștere și deci să exercite o mai mare acțiune asupra plantulei, se recomandă ca în momentul în care se pregătește soluția de colchicină să se adauge puțin agar-agar, pentru a împiedica scurgerea

de pe vîrful de creştere sau o rapidă evaporare. De asemenea pentru a împiedica sau micşora intensitatea evaporării soluţiei apoase, după tratament, plantele se acoperă cu tocuri de geam şi rogojini (Tabelul nr. 18).

Aceeaşi metodă se foloseşte pentru obţinerea plantelor poliploide la pepenele galben *(Cucumis melo)*.

Cicer arietinum (năutul) 2n = 14. Se tratează seminţele prin imersionarea lor în soluţia de colchicină 0,25% timp de 30 minute (S. Ramanujan şi A. Joshi, 1943).

Lactuca sativa (salata) 2n = 18.

Seminţele se imersionează în apă timp de 24 ore, după care sînt transferate în soluţie apoasă de colchicină 0,5—0,1% pentru 24 ore (M. Bragdö, 1955).

Spinacia oleracea (spanac) 2n = 12.

Seminţele se păstrează în apă timp de 24 ore. După îmbibarea cu apă, seminţele se imersionează într-o soluţie de colchicină 0,1% pentru 48 ore sau 0,2% timp de 24 ore. Se recomandă să se lucreze cu atenţie pentru a nu fi atinse cu colchicină radicelele (M. Bradgö).

Fagopyrum esculentum (hrişca) 2n = 16.

Se tratează plantulele tinere prin imersionarea vîrfului de creştere în soluţie de colchicină 0,3—0,4%, timp de 2 ore.

PLANTE FURAJERE

Trifolium pratense (trifoiul) 2n = 12. Pentru obţinerea formelor tetraploide de trifoi se folosesc soluţii apoase de colchicină în diferite concentraţii 0,1; 0,15 0,2; 0,25; 0,3% (Levan, 1940; Welsen, 1950; J. Brewbaker, 1952; Bragdö, 1954; De Rao, 1955; Speckmann 1958). Se utilizează diferite procedee:

— Seminţele se pun la germinat pe hîrtie de filtru. După germinare, plantulele sînt scufundate cu vîrful de creştere în soluţie de colchicină, timp de 1, 2, 3 ore. Se recomandă să se evite scufundarea rădăcinilor în colchicină, care fiind mai sensibile se necrozează. Pentru a evita uscarea rădăcinilor se acoperă cu o hîrtie de filtru sau vată, îmbibate cu apă. În laboratorul de genetică vegetală a facultăţii de biologie a Universităţii din Bucureşti s-au experimentat următoarele metode:

— Seminţele se pun la germinat pe hîrtie de filtru. Imediat după germinare, seminţele se imersionează în soluţie de colchicină evitînd scufundarea radicelelor.

— Seminţele se imersionează în apă timp de 6, 12, 24 ore, după care sînt supuse influenţei colchicinei, prin imersionare sau infiltraţie prin vacuum.

— Seminţele se însămînţează în lădiţe de pămînt. După încolţire, se tratează vîrful de creştere, prin depunerea unei picături de colchicină în concentraţie de 0,2% timp de 3 zile, de trei ori pe zi sau concentraţia 0,1% timp de 6 zile.

Se recomandă să se trateze un număr mare de seminţe sau plantule, deoarece procentul plantelor tetraploide ce rezultă este foarte

Tabelul nr. 18

Rezultatele tratamentului cu colchicina la plantele diploide

Soiul	Anul tratamentului	Conc. sol. %	Nr. zile de tratament	Plante tratate		Plante modificate morfologic %	Plante ce au pierit %	Plante poliploide	
				Nr.	%			Nr.	%
Arad	1963	0,2	4	468	100	41,2	11,7	—	—
		0,4	4	468	100	37,2	19,2	6	1,3
Brăila	1963	0,2	4	156	100	37,2	13,4	—	—
		0,4	4	250	100	50,0	17,2	3	1,1
Graybelle	1964	0,4	6	98	100	50,0	27,9	1	0,98
Kleckley sweet	1965	0,4	6	254	100	45,1	29,5	3	1,16
Timburești	1963	0,2	4	130	100	48,5	16,9	—	—
		0,4	4	78	100	58,9	33,3	—	—
	1965	0,4	6	264	100	46,9	31,2	4	1,51
Linia 5-a	1967	0,4	6	221	100	50,2	26,9	1	0,45

©RedAbaris 2013

redus. Aceleași procedee se folosesc pentru obținerea plantelor autotetraploide la *Trifolium hybridum, T. repens, T. incarnatum, T. resupinatum.*

C. Pamfil și colab. (1969) au folosit mai multe metode de tratament pentru obținerea formelor poliploide de trifoi. S-au folosit soluții apoase de colchicină de 0,1%, 0,15%, 0,20%, 0,25% și 0,30%. Concentrația 0,3% a provocat moartea în masă a materialului tratat. (Tabelul nr. 19).

Din tabelul de mai sus reiese că rezultatele cele mai bune s-au obținut prin tratarea semințelor îmbibate în apă 24 ore și supuse infiltrației prin vacuum, de 3 ori timp de 5 minute.

Lolium perene 2n = 14. Se tratează semințele germinate sau negerminate, prin imersionarea în soluție apoasă de colchicină 0,2% timp de 3 ore. Tratamentul se efectuează la temperatura de 25°C (Alhoowalia, 1966).

Medicago sativa (lucerna) 2n = 32. Semințele se pun la germinat pe hîrtie de filtru. După germinare, plantele tinere se introduc cu vîrful de creștere în soluție de colchicină 0,2%, timp de 1—2 ore. Se recomandă să se evite scufundarea radicelelor pentru a nu se necroza. După transplantarea în cîmp se continuă tratarea încă 2 zile, prin pipetarea unei picături de colchicină pe vîrful de creștere (Evans, 1955).

PLANTE INDUSTRIALE ȘI MEDICINALE

Beta vulgaris (sfecla de zahăr) 2n = 18. Pentru obținerea plantelor autotetraploide s-au elaborat mai multe metode de tratament cu colchicină.

Metoda Rosen. Semințele se însămînțează în ghivece sau vase de vegetație. După răsărire, plantele se supun unui șoc de temperatură (25—27°C), timp de 30—60 minute, pentru a mări frecvența diviziunilor celulare din vîrful de creștere. Înainte de 24 ore de efectuarea tratamentului, plantele nu se mai udă. Tratamentul constă în stropirea plantulelor cu o soluție apoasă de colchicină 0,4% folosindu-se cca. 35 cm^3 soluție la un ghiveci cu diametrul de cca. 7 cm. Prin această metodă s-a obținut un procent ridicat de plante autotetraploide (80—90%).

Folosind această metodă H. Feltz (1953) a obținut 14 plante autotetraploide.

Z. Stănescu (1969) a utilizat mai multe metode pentru obținerea plantelor poliploide.

— Semințele germinate sînt imersionate în soluție de colchicină 0,05% timp de 6 ore sau 0,1% pentru 4 ore.

— Se tratează vîrful de creștere prin depunerea unui tampon de vată îmbinat cu soluție de colchicină 0,25% timp de 20 zile.

— Tratarea vîrfului de creștere cu colchicină 1% prin depunerea unei picături de colchicină timp de 9—15 zile.

Helen Savitsky (1965) descrie un număr mare de metode pentru obținerea plantelor autotetraploide, utilizate de diferiți autori.

F. Schwanitz (1938) a folosit o soluție de colchicină 0,5% iar tratamentul l-a efectuat prin pulverizarea inflorescențelor.

J. Rasmusson și A. Levan (1939) au tratat semințe germinate prin imersionarea lor în soluție de colchicină 1%. Din 84 plante stu-

Metode de tratament pentru obținerea poliploizilor la trifoiul roșu
(C. Pamfil și colab. 1969)

Metode de tratament aplicate	Conc. colchicină %	Nr. de plante sau semințe tratate	Nr. de plante ce au supraviețuit	% plante poliploide raportate la :		% plante mixoploide raportate la :	
				plante tratate	plante supraviețuitoare	plante tratate	plante supraviețuitoare
1	2	3	4	5	6	7	8
1. Tratat vîrful de creștere la plantulele în stare cotiledonară de 3 ori/zi, 6 zile	0,10	102	25	2,9	12,0	3,9	15,0
	0,15	120	14	—	—	—	—
	0,20	104	8	1,0	12,5	1,0	12,5
	0,25	124	13	4,8	46,1	3,2	30,7
2. Plantule în faza de cotiledoane au fost supuse unei infiltrații prin vacum de 3 ori în 5 minute	0,10	100	29	—	—	5,0	17,2
	0,15	100	31	1,0	3,2	5,0	16,1
	0,20	100	27	1,0	3,7	5,0	14,7
	0,25	100	28	3,0	10,7	3,0	10,7
3. Semințele au fost îmbibate în apă timp de 12 ore, apoi supuse infiltrației prin vacum de 3 ori în 5 minute	0,10	100	21	2,0	9,7	2,0	9,0
	0,15	100	14	—	—	2,0	14,2
	0,20	100	27	1,0	5,7	2,0	7,4
	0,25	100	11	3,0	27.2	1,0	9,0
4. Semințele au fost îmbibate în apă 24 ore și supuse infiltrației prin vacum de 3 ori în 5 min.	0,10	100	22	6,0	27,2	1,0	4,5
	0,15	100	17	3,0	17,6	1,0	5,8
	0,20	100	11	—	—	1,0	9,0
	0,25	100	2	—	—		50,0
5. Semințele îmbibate în soluție apoasă de colchicină timp de 12 ore	0,10	100	15	1,0	6,6	4,0	26,6
	0,15	100	7	1,0	14,2	1,0	14,2
	0,20	100	3	1,0	33,3	—	—
	0,25	100	5	0	—	—	—

©RedAbaris 2013

diate 3 au fost autotetraploide. Folosind această metodă Ernould a obținut 2 plante autotetraploide din 91 de plante studiate.

Lynes F. și C. Harris (1942) au reușit să obțină un mare număr de plante autotetraploide din semințele rezultate, din florile tratate cu colchicină 0,2%.

A. Schlösser (1940) a imersionat ramuri în colchicină 0,4% timp de 24 ore sau mai mult. 8% din plantele tratate au dat descendenți tetraploizi. De asemenea a imersionat semințe în apă timp de 3 zile și apoi au fost transferate în soluție de colchicină 0,4% pentru 3 zile.

Abegg A. (1940) a tratat plantule, prin pipetare, pe vîrful de creștere, a unei picături de colchicină 0,2% sau 0,4% timp de 4 sau 8 zile. Din 94 plante tratate, 45 prezentau ramuri cu un număr variabil de flori cu polen diploid. De asemenea a imersionat semințe în soluție de colchicină 0,4% timp de 8 ore, 1, 2, 3 zile.

S. Matsumura și Kjamashita (1941)au obținut rezultate bune prin pipetarea vîrfului de creștere, cu colchicină, în concentrație de 0,2 și 0.4%.

Sedlmayr K. (1955) și A. Varga (1961) au tratat plantule în stare coltiledonară, prin aplicarea pe vîrful de creștere a unei picături de colchicină 0,2 sau 0,1%.

Artschwayer E. (1940) a tratat semințe uscate cu colchicină 0,5% timp de 8 ore sau mai mult, sau semințele au fost păstrate în apă 24 ore și apoi transferate în colchicină 0,5% pentru 10 ore. Deși un număr mare de plantule au murit, datorită concentrației și timpului de tratament, un însemnat număr de plante au devenit tetraploide.

Pető H. și Hill K. (1942) au tratat semințe uscate cu colchicină 0,1% timp de 48—96 ore. Pentru aceasta semințele au fost puse pe hîrtie de filtru îmbibată cu colchicină, în vase Petri. În Co plantele au fost selecționate după mărimea stomatelor și a polenului, depistînd un procent ridicat de plante autotetraploide (75%).

Ernould L. (1946) a scufundat semințe uscate în colchicină 0.2, 0,4 și 0 8 % timp de 7 zile. De asemenea a imersionat semințe uscate în apă timp de 48 ore și transferate apoi în colchicină 0,2, 0,4 și 0,8% pentru 5 zile sau 3 zile în apă și apoi 4 zile în colchicină.

Knapp E. (1958) a tratat 285 semințe în stadiu de germinare, cu colchicină 0,2% timp de 2 și 3 zile. Plantulele obținute au fost grupate în 3 grupe : 1 — 144 plantule au fost normale ; 2 — 101 plantule au prezentat hipocotilul îngroșat, din care au rezultat 14% plante cu ramuri tetraploide. Din 18 plante ce prezentau modificări mai accentuate 33% au format ramuri tetraploide. Toate aceste ramuri au dat în descendență 80—90% plante tetraploide.

Kloen D. și Speckman G. (1654). Semințele au fost imersionate în apă timp de 2 ore după care au fost uscate în curent de aer cald (35°C). Apoi au fost ținute în curent de apă pentru 2 ore. Semințele astfel pregătite au fost puse la germinat, la 28 C. După 1—2 zile, cînd marea majoritate a semințelor au germinat, s-a efectuat tratamentul cu o soluție de colchicină 0,1% timp de 3 ore. Aproximativ 24% din plantele ce s-au dezvoltat din aceste semințe au fost tetraploide.

Rosenthal Ch. (1959) a utilizat diferite metode de tratament și a obținut următoarele rezultate.

Prin tratarea plantelor din F_1 s-au obținut 2,09% plante tetraploide; tratarea rozetei a dat 3,77% poliploizi, a coroanei 25,42%, a plantulelor 56,67% iar prin tratarea semințelor al rezultat 71,17% poliploizi.

Helen Savitsky (1952, 1954) a tratat plantule prin imersionarea vîrfului de creștere în soluție de colchicină. Cele mai bune rezultate au fost obținute prin folosirea concentrației de 0,3 și 0,5% colchicină. Tratînd plantulele în diferite stadii de dezvoltare a ajuns la concluzia că procentul plantelor tetraploide rezultate, crește odată cu descreșterea vîrstei plantulei. Astfel, prin tratarea plantulelor cu frunzele deja apărute dintre cotiledoane cu colchicină 0,3% au rezultat 2,9% plante tetraploide, plantulele mai tinere cu frunzele în stadiu rudimentar au dat 29,4% tetraploizi, plantule și mai tinere decît cele precedente au produs 40% plante tetraploide, în timp ce prin tratarea semințelor germinate s-au obținut 42,8% plante poliploide (tabelul 20).

Tabelul nr. 20

Rezultatele tratamentului cu colchicina (Helen Savitsky, 1966)

Concentrația colchicinei — în % —	Plantele tetraploide obținute prin tratarea semințelor timp de 16 ore — % —		Plantele tetrapoide obținute prin tratarea semințelor timp de 6 ore — % —	
	Semințe negerminate	Semințe germinate	Semințe negerminate	Semințe germinate
0,1	0	0	0	0
0,2	0	0	0	83,92
0,3	0	8,34	33,33	28,64
0,4	0	50,00	68,57	75,00
0,5	41,67	69,70	79,00	58,34
0,8	66,67	33,33	59,60	39,39
Media	18,06	26,89	39,42	47,55

Citām după Z. Stănescu (1970) mai multe metode de tratament cu colchicină ce au dat rezultate bune în obținerea plantelor poliploide.

Glomerulele se seamănă în ghivece, vase de vegetație sau lădițe în care se găsește turbă. După răsărire se tratează vîrful de creștere prin depunerea unei picături de colchicină 1% între frunzele cotiledonare. Tratamentul se repetă după 3 ore timp de 8—14 zile, folosindu-se o soluție de colchicină 0,1%. Prin folosirea acestei metode s-a obținut un procent ridciat de plante poliploide (70—80).

În timpul experiențelor se recomandă să se asigure o temperatură de 16—20°C și o umiditate a solului de 70—80%. Trebuiesc evitate razele directe ale soarelui și asigurat o lumină difuză (cca. 300 vați/m²) timp de 14—15 ore.

— Glomerulele se seamănă în ghivece, la adîncime de 1,5 cm. Cînd germenii încep să apară, ghivecele se introduc într-un frigider la +5 — +7°C timp de 8—10 ore, după care se readuce în seră sau răsadnițe.

După 24 ore vasul se udă cu o soluție de colchicină 0,5%, 60—80 cc. pentru fiecare vas.

— Semințele se pun la germinat pe hîrtie de filtru, în vase Petri. În momentul în care germenii au radicela de 0,5 cm lungime, se introduc în soluție de colchicină 0,1—0,2% timp de 8—12 ore. Se obțin cca. 10% plante poliploide.

— Plantulele în stare cotiledonară se imersionează în soluție de colchicină 0,3—0,5% timp de 6—12 ore,la temperatura de 25—27°C. Procentul de plante poliploide ce rezultă este redus.

— Tratarea lăstarilor floriferi. Se reține 2—3 lăstari viguroși, ceilalți se îndepărtează, în momentul în care lăstarii au 7—8 cm lungime. Pe vîrful de creștere se aplică cîte o picătură de colchicină 0,3%. Tratamentul continuă cîteva zile. Se poate de asemenea efectua tratamentul prin imersionarea lăstarilor floriferi într-o soluție de colchicină 0,3%. Această metodă prezintă avantajul că permite obținerea formelor tetraploide în anul tratamentului.

— Tratarea butașilor. Capetele rădăcinilor scoase din siloz se curăță de resturile de frunze și se ung cu o soluție de colchicină + agar 1—2%. Rădăcinile se plantează în ghivece și se continuă tratamentul 6—12 ore..

Aceste metode se pot folosi cu același rezultat pentru obținerea formelor poliploide la sfecla furajeră.

Linum usitatissimum (inul). Plantulele în stadiul cotiledonar se imersionează cu vîrful de creștere într-o soluție de colchicină 0,2—0,3% timp de 2 ore sau 0,05% timp de 24—48 ore, la temperatura camerei (D. E. Bremer-Reinders și G. Bremer, 1952).

Van Kenon (1965) a obținut rezultate pozitive în obținerea plantelor poliploide la inul de fuior, prin tratarea semințelor în timpul germinației cu o soluție de colchicină 0,10% sau a plantulelor în stare cotiledonară.

Gossypium hirsutum (bumbacul) 2n = 52. Semințele se imersionează în apă timp de 24 ore, după care li se îndepărtează tegumentul și se pun la germinat. După germinare se tratează vîrful de creștere prin imersionare în soluție de colchicină 0,3—0,5% timp de 6 ore (H. Douwes, 1952).

Nicotiana tabacum (tutunul) 2n = 48. S-au obținut forme tetraploide de tutun, prin tratarea semințelor cu soluții apoase de colchicină sau acenaften. Astfel Gh. Papaioannou (1960) a tratat semințele în timpul germinației, cu soluție apoasă de colchicină 0,1% și 0,5% timp de 24—48 ore. Prin tratarea semințelor timp de 48 ore cu o soluție de colchicină 0,1% a obținut 9,1% plante tetraploide, în timp ce prin folosirea colchicinei 0,5% timp de 24 ore a rezultat 31,3% de plante tetraploide.

Se pot trata plantele în stare cotiledonară, prin depunerea unei picături de colchicină 0,1—0,5% pe vîrful de creștere timp de 1—3 zile.

Rezultate pozitive s-au obținut prin tratarea semințelor încolțite cu o soluție de acenaften în concentrație de 0,2 g/vas Petri (Ternovski, 1965).

Datura stramonium (ciumăfaia) 2n = 24. Se tratează semințe germinate cu soluții de colchicină 0,1—0,4% timp de 1—4 zile. Cele mai

bune rezultate s-au obținut prin tratarea semințelor cu o soluție de colchicină 0,3% timp de 72 ore (V. Olteanu, 1961).

Brasica rapa rapifera (rapița). Semințele se însămînțează în lădițe. După răsărire se tratează plantele în stare cotiledonară prin depunerea unei picături de colchicină 0,5—1% pe vîrful de creștere timp de 10 zile.

PLANTE ORNAMENTALE

Antirrinum majus (gura leului) 2n = 16. Semințele se însămînțează în lădițe cu pămînt și se păstrează în seră.

Pentru obținerea plantelor autotetraploide se folsește o soluție de colchicină 0,5%. Sînt tratate plantulele tinere, prin pipetarea unei picături de colchicină pe vîrful de creștere timp de mai multe zile. Se transplantează în cîmpul de experiențe plantele puternic modificate morfologic (D. Duma, 1970).

Ageratum mexicanum. 2n = 20. Prin tratarea a 490 plantule cu soluție apoasă de colchicină 0.5% și 0,9% D. Duma, (1967) a obținut 3 plante autotetraploide și 6 plante mixoploide.

Salvia splendens (salvia). Se tratează semințe germinate cu o soluție apoasă de colchicină 0,1% timp de 12—24 ore.
de plante autotetraploide.

Prin această metodă Lutkov (1963) a obținut un procent ridicat de plante autotétrapoide.

Lilium longiflorum Thunb. (crinul). 2n = 24. Pentru obținerea formelor poliploide de crin se tratează bulbii prin imersionarea în soluția de colchicină 0,05% timp de 24 ore sau 0,1, 0,25 0,5 și 1% timp de 1, 2 și 3 ore. Cele mai bune rezultate s-au obținut prin folosirea concentrației de 0,2% timp de 2—3 ore (S. Emsweller, 1947) (tabelul nr. 21)

Tabelul nr. 21

Rezultatele tratamentului cu colchicina (S. Emsweller, 1971)

Bulbi tratați	Plante tetraploide		Plante aneuploide		Himere	
	nr.	%	nr.	%	nr.	%
303	123	40,5	8	2,6	37	12,2

ARBORI ȘI ARBUȘTI

În ultimii ani au fost inițiate o serie de cercetări pentru obținerea pe cale experimentală a formelor poliploide la arbori și arbuști. Astfel, s-au obținut forme autotetraploide la măr, dud.

Pirus domestica (măr 2n = 34). Metoda Dermen. Tratamentul cu colchicină a fost efectuat în diferite stadii de dezvoltare a plantelor : muguri, plante tinere. S-a folosit în prima variantă o soluție de colchicină 1% la care s-au adăugat 6 picături de soluție Sontomerse 10% la 10 cc. de colchicină. În varianta a doua s-a folosit de asemenea soluție apoasă de colchicină 1% la care s-a adăugat soluție de glicerină 50% și Santomerse. Tratamentul a fost efectuat în 3 variante.

a — un grup de plante a fost tratat cu soluție de colchicină 1% ;

b — al doilea grup de plante a fost tratat cu soluție apoasă de colchicină, urmat de un tratament cu soluție de colchicină + glicerină ;

c — ultimul grup de plante a fost tratat cu soluție de colchicină + glicerină. Tratamentul a fost efectuată prin depunerea de colchicină pe vîrful de creștere pînă la saturare, timp de o zi sau tratamentul a fost repetat de 4 ori, la un interval de 4 zile. Un grup de plante au fost tratate timp de 5 zile consecutiv. Plantele, din grupul al doilea, au fost tratate cu soluție de colchicină 1—3 ori și 2 ori cu soluție de colchicină și glicerină la un interval de 2 zile. Tratamentul efectuat cu soluție de colchicină și glicerină a fost repetat de 2 ori la interval de 2 zile. Gradul de ploidie a fost determinat după 2 ani după aspectul morfologic al plantelor și mărimea grăuncioarelor de polen.

Din 355 plante tratate s-au identificat a fi poliploide 9 plante, 2 plante poliploide din 17 din grupa a, 5 din 13 plante din grupa b și 2 din 3 plante din grupa c.

— Se tratează mugurii apicali ai lăstarilor tineri. În momentul în care lăstarii au 20—30 cm se decapitează mugurii apicoli și li se aplică o capsulă de gelatină cu o soluție de colchicină 1% într-o soluție apoasă agar-agar 0,65% timp de 24 ore. Lăstarii subaxiali se îndepărtează, pentru a forța creșterea apicală (după Z. Stănescu, 1970).

Morus sp. (dudul) 2n = 28. Metoda Radjabi (1963). Semințe negerminate sînt imersionate în soluție de colchicină 0.02%—0,03% la temperatura de 28—30°C, timp de 12—24—48 ore.

Vitis vinifera (vița de vie). H. Dermen (1964) a utilizat o metodă asemănătoare cu cea descrisă la măr. A folosit o soluție de colchicină 0,5% la care a adăugat 10% glicerină și 1—2 picături de Satomerse, pentru 10 ml soluție colchicină + glicerină. Butașii se plantează în ghivece în așa fel încît la suprafață să rămînă un singur ochi. În momentul în care lăstarul are cca. 15 cm lungime, se începe tratamentul prin depunerea unei picături de colchicină pe primii doi-trei muguri de la vîrful lăstarului. Ceilalți muguri se îndepărtează. Se tratează timp de 4—6 zile, la un interval de 3 zile. Se poate de asemenea, folosi un tampon de vată îmbibat în colchicină.

M. Neagu și V. Lepădatu (1961) au utilizat diferite metode de tratament: imersionarea semințelor germinate în soluție de colchicină 0.2%, acoperirea mugurilor cu un tampon de vată îmbibat cu soluție de colchicină ; tratarea repetată a vîrfului de creștere a plantelor rezultate din semințe.

Cu ajutorul acestor metode s-au obținut plante poliploide la *Vitis vinifera, V. rotundifolia, V. aestivalis.*

13. TEHNICI DE IDENTIFICARE A POLIPLOIZILOR

Depistarea plantelor autotetraplooide, obținute în urma tratamentului cu colchicină, se poate face în bune condiții cu ajutorul metodelor indirecte, macroscopice și microscopice.

După cum se știe, colchicina determină profunde modificări anatomomorfologice și fiziologice ce pot fi evidențiate prin studiul compa-

rativ al plantelor tratate şi netratate. Astfel, ritmul de creştere al plantelor tratate este mai lent, se schimbă raportul dintre lungimea şi lăţimea frunzei, forma, grosimea şi culoarea frunzelor şi tulpinilor (fig. 100).

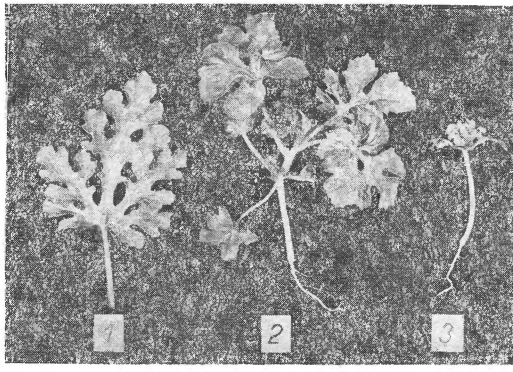


Fig. 100 — Frunză de la plantele martor (1) şi plantele modificate în urma tratamentului cu colchicină (2, 3) de la *Citrullus lanatus*.

Pe această bază sînt reţinute plantele puternic modificate morfologic şi eliminate cele nemodificate sau cele la care modificările nu sînt evidente. Depistarea plantelor poliploide se face prin intermediul unor metode indirecte care se bazează pe corelaţia care există între gradul de poliploidie şi anumite caractere morfologice macro- şi microscopice ale plantelor *numărul de cloroplaste în stomate, densitatea stomatelor în cîmpul microscopului (sau pe unitatea de suprafaţă), dimensiunea (lungimea) stomatelor, dimensiunea, fertilitatea polenului, numărul de pori germinativi ai polenului* (tab. 104—105).

Aceste metode se folosesc frecvent în experienţele de obţinere a plantelor poliploide pentru verificarea gradului de ploidie, deoarece prezintă avantajul că sînt metode simple, comode şi rapide. Ceea ce este important este faptul că pot fi folosite chiar în anul tratamentului, imediat după transplantarea plantelor în cîmp sau în momentul alegerii plantelor pentru transplantare (în răsadniţe sau seră), fiind posibil să se elimine plantele nemodificate sau cele care au reacţionat numai partial la tratamentul cu colchicină (plantele mixoploide) şi care de regulă se dezvoltă spre diploide. În felul acesta se pot continua experienţele cu un număr redus de plante, puternic modificate, crescînd astfel şansa de a obţine plante complet tetraploide şi uşurîndu-se activitatea în anul tratamentului cu colchicină.

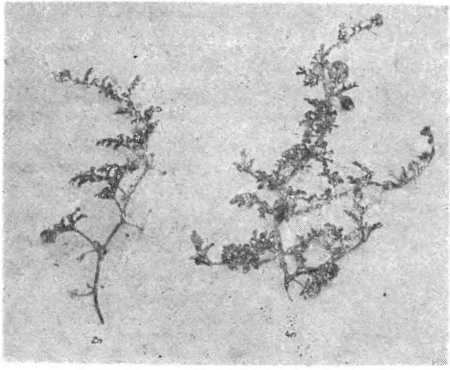


Fig. 101 — Ramuri de la o plantă diploidă (stîngă) și autotetra-_ploidă (dreapta) de la *Citrullus lanatus.*

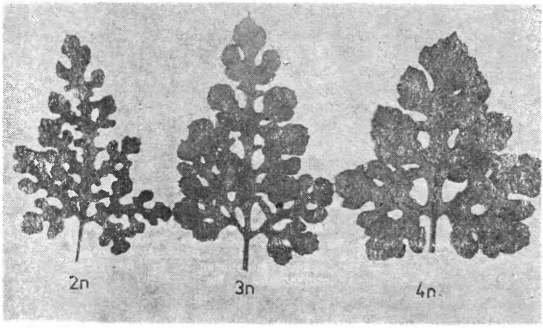


Fig. 102 — Frunze de la plante diploide, triploide și tetraploide de *Citrullus lanatus*

Aceste metode se pot folosi cu rezultate pozitive și pentru verificarea gradului de poliploidie (tetraploide, triploide etc.) în generațiile următoare în acțiunea de ameliorarea plantelor poliploide și pentru

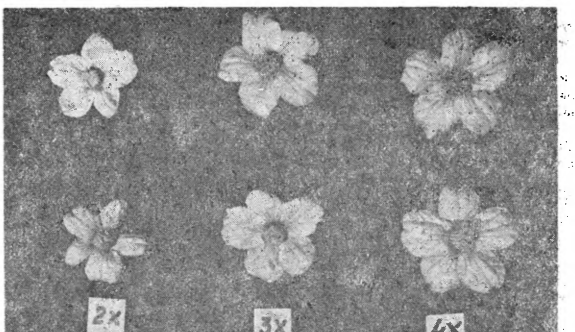


Fig. 103 — Flori de la plantele diploide (2x), triploide (3x) și tetraploide (4x) de Citrullus lanatus.

eliminarea eventualelor plante mixoploide ce pot apare ca urmare a segregării plantelor poliploide.

11.3.1. NUMĂRUL DE CLOROPLASTE ÎN STOMATE

Pentru numărarea cloroplastelor din celulele stomatelor cît și pentru studiul dimensiunii și densității stomatelor în cîmpul microscopic (unitate de suprafață) se folosește metoda colorării cu soluție de iod în iodură de potasiu.

Ținînd seama de faptul că numărul de cloroplaste, densitatea stomatelor variază destul de mult pe suprafața aceleași frunze și în funcție de vîrstă, mărimea și locul de inserție al acesteia pe tulpină se recomandă să se folosească o porțiune din epiderma inferioară, din aceeași regiune de pe frunze, de aceeași vîrstă, la toate variantele diploide, triploide și tetraploide sau de la plantele tratate și martor. Observațiile se pot efectua la frunzele proaspete sau conservate. Conservarea frunzelor se poate face în formaldehidă 4%, alcool-acetic 3 : 1, alcool etilic 70°, acid picric 1%. Desprinderea epidermei se face cu ajutorul unei pensete sau ac spatulat. Frunzele sînt recoltate dimineața, după o oră de la răsăritul soarelui. Pe timp înourat se recomandă introducerea frunzelor recoltate cu pețiolul într-un vas cu apă de robinet și plasarea la lumina unui bec electric pentru a mijloci acumularea amidonului în cloroplaste, ca urmare a intensificării fotosintezei. Se desprinde o porțiune din epiderma inferioară (circa 5 mm) și se pune pe o lamă de sticlă, curată și uscată, într-o picătură de iod în iodură de potasiu, pentru 2—3 minute. În acest timp cloroplastele se colorează în galben maron, putînd fi ușor puse în evidență. Peste epidermă se plasează o

lamelă, iar cu ajutorul unei hîrtii de filtru se îndepărtează excesul de reactiv și se fixează lamela. Preparatul poate fi observat la microscop cu obiectivul 20 sau 40. Pe același preparat se pot efectua mai multe determinări și anume numărul cloroplastelor în stomate și în celulele epidermei, densitatea stomatelor în cîmpul microscopic, dimensiunea stomatelor. Datorită corelației care există între gradul de poliploide și caracterele anatomomorfologice se constată o creștere semnificativă a numărului de cloroplaste în stomate, în celulele epidermei și în țesutul palisadic proporțional cu gradul de poliploidie (fig. 104) (tabelul 22).

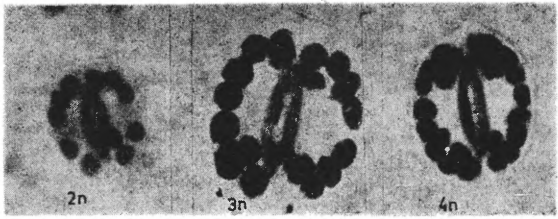


Fig. 104 — Cloroplaste în stomatele plantelor diploide (2n), triploide (3n) și tetraploide (4n) de *Citrullus lanatus*.

11.3.2. DIMENSIUNEA ȘI NUMĂRUL DE STOMATE

La formele poliploide (tetraploide și triploide) dimensiunea stomatelor este considerabil mai mare la triploizi și tetraploizi comparativ cu formele diploide. Din această cauză numărul de stomate pe unitatea de suprafață este mai mic la formele poliploide (Tabelul 23 în 24).

Diferențele între mediile formelor diploide și cele triploide și tetraploide sînt foarte semnificative (fig. 105).

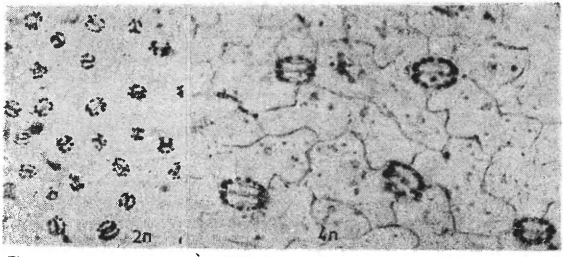


Fig. 105 — Frecvența stomatelor în cîmpul microscopic de la plantele diploide (2n) și tetraploide (4n) de *Citrullus lanatus*.

Numărul de cloroplaste în stomate

Specia	Soiul	Gradul de poliploidie	Nr. de obs. (n)	$\bar{X} \pm s\bar{x}$	Limitele de variație	Val. relativă în %	Diferențe	Semnif. diferenței	Autorul și anul
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ageratum mexicanum		2n	200	7,92 ± 0,12	7—12	100	—	—	D. Duma 1965
		4n	200	10,00 ± 0,16	7—18	151,5	+ 4,08	xxx	
Antirrhinum majus	Brilanroza	2n	100	16,28 ± 0,2	11—12	100	—	—	D. Duma 1965
		4n	200	28,37 ± 0,49	16—41	171,26	+12,09	xxx	
Beta vulgaris	Marlbo P.A.	2n	500	14,03 ± 0,0	9—19	100		—	I. Popovici 1965
		3n	500	20,42 ± 0,09	15—27	100	+ 6,39	xxx	
		4n	500	25,20 ± 0,13	18—33	100	+10,17	xxx	
Citrullus vulgare	Arad	2n	2500	14,48 ± 0,2	8—27	100	—	—	I. Anghel 1969
		3n	2500	21,72 ± 0,2	16—30	100	+ 7,76	xxx	
		4n	2500	26,1 ± 0,2	17—42	100	+16,62	xxx	
	Brăila	2n	2500	12,83 ± 0,2	7—23	145,5	—	—	
		3n	2500	20,92 ± 0,3	19—31	179,6	+ 8,9	xxx	
		4n	2500	24,72 ± 0,2	13—39	142,4	+11,89	xxx	
Capsicum annuum	Colnicov	2n	200	14,04 ± 0,15	9—20	180,2	—	—	V. Olteanu 1965
		4n	400	27,85 ± 0,16	20—36	179,7	+13,81	xxx	
Trifolium pratense	Bernburg	2n	200	6,43 ± 0,06	4— 9	190,2	—	—	I. Anghel 1969
		4n	200	12,42 ± 0,09	10—16	204,77	+ 5,99	xxx	
	E—58 E—59	2n	200	6,74 ± 0,08	4—10	193,0	—		
		4n	200	12,28 ± 0,10	10—17	182,19	+ 5,54	xxx	

©RedAbaris 2013

Dimensiunea stomatelor în microni

Specia	Soiul	Gradul de poliploidie	Nr. de obs. (n)	$\bar{X} \pm s\bar{x}$	Limitele de variație	Val. relativă în %	Diferențe	Semnif. diferenței	Autorul și anul
Ageratum mexicanum	—	2n	200	19,89±0,18	13—24	100	—	—	
		4n	200	29,35±0,40	17—39	147,5	+ 9,45	xxx	D. Duma
Antirrhinum majus	Brilanroza	2n	100	15,57±0,12	12—18	100	—		
		4n	200	23,37±0,31	11—34	150,1	+ 7,77	xxx	D. Duma
Beta vulgaris	Maribo P.A.	2n	300	21,38±0,17	18—36	100	—	—	I. Popovici 1965
		3n	300	32,05±0,22	22—45	149,9	+10,67	xxx	
		4n	300	38,49±0,31	22—54	180,0	+17,11	xxx	
Capsicum annuum	Colnicov	2n	200	21,61±0,17	13—27	100	—		V. Olteanu 1965
		4n	400	29,36±0,26	17—44	135,9	+ 7,16	xxx	
Citrullus vulgare	Arad	2n	2.500	24,3 ±0,2	15—32	100	—	—	I. Anghel 1969
		3n	2.500	32,1 ±0,2	28—39	134,3	+ 8,2	xxx	
		4n	2.500	34,0 ±0,2	27—40	139,6	+ 9,64	xxx	
	Brăila	2n	2.500	24,5 ±0,2	17—32	100	—	—	
		3n	2.500	31,0 ±0,2	28—38	128,9	+ 6,94	xxx	
		4n	2.500	34,16±0,3	26—42	139,0	+ 9,66	xxx	
Raphanus sativus	Jumătate albă	2n	100	11,94±0,12	9M14	100	—	—	Popescu Constanța 1965
	Jumătate roșie	4n	100	18,68±0,24	14—25	155,5	+ 6,64	xxx	
Trifolium pratense	Eiszapfen	2n	100	12,81±0,12	9—15	100	—	—	I. Anghel 1965
		4n	300	18,98±0,14	11—24	148,1	+ 6,17	xxx	
	Bernburg	2n	200	20,86±0,12	17—27	100	—	—	
		4n	200	26,95±0,15	15—30	129,2	+ 5,99	xxx	
	E—58	2n	200	19,73±0,12	15—25	100	—	—	
	E—59	4n	200	26,15±0,10	25—32	132,5	+ 6,49	xxx	

©RedAbaris 2013

Tabelul nr. 24

Frecvența stomatelor

Specia	Soiul	Gradul de poliploidie	Nr. de obs. (n	$\bar{X} \pm s\bar{x}$	Limitele de variație	Val. relativă în %	Diferențe	Semnif. diferenței	Autorul și anul
Ageratum mexicanum	—	2n	200	15,99±0,2	8—24	100		—	D. Duma 1965
		4n	200	6,20±0,18	4—15	38,8	— 9,78	000	
Antirrhinum majus	Brilanroza	2n	200	14,52±0,16	10—17	100			D. Duma 1965
		4n	200	7,03±0,19	3—13	48,4	— 7,48	000	
Beta vulgaris	Mariibo P.A.	2n	300	20,75±0,20	14—29	100	—		I. Popovici 1965
		3n	100	12,67±0,28	8—19	61,1	— 8,08	000	
		4n	100	9,99±0,13	8—13	48,1	—10,76	000	
Capsicum annuum	Colnicov	2n	200	30,75±0,48	16—43	100	—	—	V. Olteanu
		4n	300	21,74±0,35	7—32	70,7	— 9,01	000	
Citrullus vulgaris	Arad	2n	2.500	32,86±0,2	20—41	100	—	—	I. Anghel 1969
		3n	2.500	14,4 ±0,3	12—26	40,9	—18,31	000	
		4n	2.500	12,26±0,2	6—19	37,3	—20,59	000	
	Brăila	2n	2.500	23,26±0,3	15—33	100	—	—	
		3n	2.500	18,3 ±0,3	14—30	76,2	— 5,71	000	
		4n	2.500	12,78±0,3	8—17	54,7	—10,52	000	
Trifolium pratense	Bernburg	2n	50	16,04±0,55	11—27	100	—	—	I. Anghel 1969
		4n	50	8,16±0,27	5—13	58,9	— 7,88	000	
	E—58	2n	50	12,76±0,27	10—17	100	—	—	
	E—59	4n	50	6,46±0,2	4—10	50 6	— 6,30	000	

©RedAbaris 2013

Pentru identificarea plantelor poliploide se pot folosi de asemenea diferențele existente între mărimea și fertilitatea polenului și numărul de pori germinativi la plantele diploide (2n), triploide (3n) și tetraploide (4n). Pentru determinarea fertilității și mărimii polenului se folosește colorarea cu carmin acetic 2%. Polenul fertil se colorează în roșu în timp ce polenul steril nu se colorează, fiind galben sau fără culoare distinctă. Măsurarea diametrului polenului se face cu micrometrul ocular și se exprimă în microni. La poliploizi grăunciorii de polen au dimensiuni mai mari, această caracteristică fiind însă una din cele mai sigure moduri de deosebire a plantelor diploide de cele tetraploide sau mixoploide. În același timp la plantele tetraploide și în special triploide crește procentul de grăunciori de polen steril. La plantele diploide polenul este mai mic și relativ uniform în timp ce la plantele autotetraploide și în special triploide este neuniform iar diametru crește proporțional cu gradul de poliploidie. În afara faptului că polenul de la plantele triploide este într-un procent foarte ridicat steril un număr important de grăunciori de polen care rezultă dintr-o tetradă nu se individualizează, fiind în același timp neuniformi (fig. 106) (Tabelul 25 și 26).

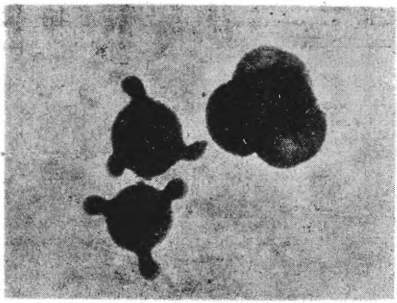


Fig. 106 — Grăunciori de polen. Se observă grăunciori de polen uniți cîte patru și cu pori germinatori.

Metodele indirecte de identificare a poliploizilor, descrise mai sus și care se bazează pe corelația existentă între gradul de poliploidie și numărul de cloroplaste în stomate, dimensiunea și frecvența (densitatea) stomatelor, mărimea, fertilitatea și numărul de pori germinativi, fiind rapide și comode și care nu necesită instalații și materiale costisitoare, pot fi folosite în fiecare școală, unitate de cercetare sau producție pentru trierea plantelor poliploide (tetraploide) obținute în urma tratamentului cu diferite substanțe chimice cît și a celor triploide ce se obțin prin hibridarea plantelor tetraploide cu cele diploide.

Tabelul nr. 25

Diametrul graunciorilor de polen în

Specia	Soiul	Gradul de poliploidie	Nr. de obs. (n)	$\bar{X} \pm s\bar{x}$	Limitele de variație	Val. relativă în %	Diferența	Semnif. diferenței	Autori
Ageratum mexicanum		2n	400	18,97±0,18	12—27	100	—	—	D. Duma 1965
		4n	300	26,50±0,16	20—33	134,4	+ 6,53	xxx	
Anthiirrhinum majus	Brilanroza	2n	100	25,50±0,12	22—30	100			D. Duma 1965
		4n	200	34,02±0,17	27—40	128,0	+ 7,52	xxx	
Citrullus vulgaris	Arad	2n	2.000	31,2 ±0,1	25—45	100	—	—	I. Anghel 1969
		4n	2.000	45,2 ±0,2	30—67	144,8	+13,9	xxx	
	Brăila	2n	2.000	31,8 ±0,1	26—44	100	—	—	
		4n	2.000	43,4 ±0,2	32—57	134,7	+11,17	xxx	
	Saxa	2n	200	18,79±0,10	15—22	100	—	—	
		4n	200	24,03±0,12	21—29	127,8	+ 5,24	xxx	
Raphanus sativus	Jumătate albă	2n	200	19,98±0,01	16—22	100	—	—	Popescu Constanța 1970
	jumătate roșie	4n	200	24,35±0,17	20—32	121,8	+ 4,35	xxx	
	Eiszapfen	2n	200	20,18±0,08	17—22	100	—	—	
		4n	200	28,55±0,13	24—31	141,4	+ 8,37	xxx	
Secale cereale	5 soiuri	2n	500	47,02±0,20	37—60	100	—	—	A. Mihăilescu 1965
	8 linii	4n	800	56,12±0,10	50—71	119,3	+ 9,10	xxx	
Trifolium pratense	Bernburg	2n	200	24,80±0,20	15—32	100	—	—	I. Anghel 1965
		4n	200	32,63±0,22	25—42	131,6	+ 7,83	xxx	
	E 58	2n	200	25,9 ±0,17	22—40	100	—	—	
	E 59	4n	200	32,05±0,22	17—32	123,7	+ 6,15	xxx	

©RedAbaris 2013

12. STRUCTURA ORGANELOR VEGETATIVE

12.1. PLANTULA

Plantula rezultă în urma diferențierii embrionului, astfel : *radicula* devine rădăcină principală, ***hipocotilul*** și ***epicotilul*** rezultat din creșterea *mugurașului* se vor transforma în tulpina propriu-zisă ; frunzele și florile apar mai tîrziu de pe tulpina și ramificațiile acesteia.

Materialele necesare : plantule de muștar alb (Sinapis alba L.), fasole (Phaseolus vulgaris L.), porumb (Zea mays L.), grîu de toamnă (Triticum aestivum L.), vase Petri, sticle de ceas, hîrtie de filtru, lupă, pensete, ac lanceolat, spatulat sau simplu, lame de sticlă.

Pregătirea materialului

1. Cu 3—4 zile înainte de lucrarea practică se pun la germinat semințele (respectiv cariopsele) de la plantele menționate, în vase Petri pe hîrtie de filtru sau sugativă permanent umectată, în prealabil sterilizate ;

— pentru porumb se folosesc vase Petri sau ghivece cu nisip curat.

2. Se acoperă cu capacul și se lasă la temperatura de 18—20°C ;

3. Într-o sticlă de ceas, cu puțină apă sau pe o lamă de sticlă umedă (umiditatea se menține adăugînd din cînd în cînd, cîteva picături de apă) se etalează plantulele pentru a le putea observa cu ajutorul lupei.

Plantula de muștar alb (Sinapis alba L.).

Analizînd macroscopic, cu ochiul liber sau cu ajutorul unei lupe plantula de muștar vom, observa următoarele zone morfologice, respectiv componente :

1. *Vîrful rădăcinii,* acoperit de piloriză (scufie sau caliptră) — o porțiune de țesut de culoare maronie ;

2. Zona netedă, lungă de 2—3(5) mm, numită astfel deoarece este lipsită de perișori absorbanți ;

3. *Zona piliferă* (sau a perișorilor absorbanți), între 10—300 mm lungime, complet acoperită cu perișori absorbanți, unicelulari ; aceștia descresc ca lungime spre vîrful rădăcinii ;

4. *Zona aspră,* este porțiunea dinspre baza rădăcinii, respectiv a coletului rezultată în urma ruperii perișorilor uscați ;

5. *Baza rădăcinii,* denumită şi colet, reprezintă porţiunea de rădăcină-hipocotil în zona căreia are loc trecerea de la structura rădăcinii la cea a tulpinii;

6. *Hipocotilul,* este porţiunea bazală a viitoarei tulpini, situată între rădăcină şi tulpină, unde se continuă procesul de trecere de la structura tulpinii; este de culoare verde şi acoperit cu peri tectori;

7. *Cotiledoanele,* sînt inserate la partea superioară, terminală a hipocotilului; sînt bilobate aşa că, la prima vedere, par a fi 4;

8. *Mugurașul* (plumula sau gemula), reprezintă vîrful hipocotilului;

9. *Epicotilul,* este axa provenită în urma creşterii mugurașului (fig. 107).

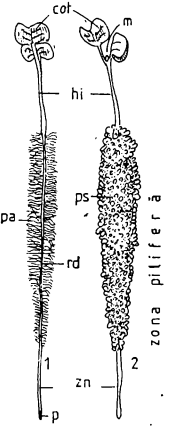


Fig. 107 — Plantula de *Sinapis alba: cot* — cotiledoane; *hi* — hipocotil; *p* — piloriză; *pa* — perişori absorbanţi; *ps* — perişori absorbanţi pe care sînt lipite particule de sol; *rd* — radiculă; *zn* — zonă netedă

Plantula de fasole (Phaseolus vulgaris L.)

Ca şi în cazul precedent, radicula este primul organ care apare la germinarea seminţei. Urmărind o plantulă de fasole vom deosebi:

1. *Vîrful rădăcinii,* protejat de piloriză;

2. *Zona netedă,* mai lungă sau mai scurtă, dar nu depăşeşte 3 mm;

3. *Zona piliferă,* urmează celei netede şi se opreşte la nivelul coletului;

Chiar de la început radicula se îndreaptă în jos, devine rădăcină principală şi începe să formeze radicele (rădăcini secundare);

4. *Hipocotilul,* este porţiunea verzuie situată în continuarea radiculei, imediat deasupra zonei radicelelor; lungimea lui este variabilă. Prin creştere el distanţează cotiledoanele de baza rădăcinii;

5. *Cotiledoanele*, primele frunze embrionare; cînd se golesc complet de substanțele de rezervă se usucă și cad;

6. *Epicotilul*, axa provenită din creșterea și dezvoltarea mugurașului care poartă primele frunze numite *protofile* sau frunze primare;

7. *Mugurele terminal*, reprezintă ansamblul alcătuit din vîrful vegetativ meristematic și frunzulițele care îl acoperă (fig. 108).

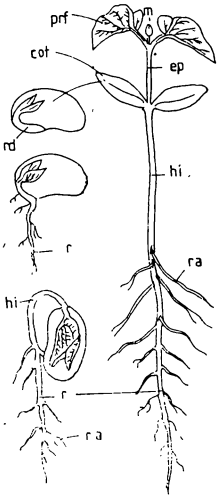


Fig. 108 — Plantula de *Phaseolus vulgaris*; *cot* — cotiledoane; *ep* — epicotil; *hi* — hipocotil; *m* — muguraș (plumulă, gemulă); *prf* — protofilă; *r* — rădăcină principală; *ra* — radicele; *rd* — radiculă.

Plantula de porumb (Zea mays L.)

Analizînd o plantulă de porumb, imediat după germinare și după 8—12 zile vom constata:

a. imediat după germinare:

1. *radicula* (rădăcina principală) de forma unui corn care străbate *coleoriza* pentru a ieși în afara cariopsei; are culoarea albă sau ușor violacee, la început simplă, ulterior se ramifică. După un timp oarecare radicula se usucă și dispare (la unele soiuri persistă, transformîndu-se în rădăcină principală);

b. după 4 zile de la germinare:

2. *Vîrful rădăcinii*, acoperit de piloriză (de culoare gălbuie);

3. *Zona netedă*;

4. *Zona piliferă*;

5. *Coletul,* respectiv baza rădăcinii și a tulpinii (hipocotilului) este înconjurat de o formațiune de natură caulinară membranoasă de culoare albă, asemănătoare unui manșon, numită *coleoriză;*

6. *Hipocotilul,* este reprezentat, de porțiunea mai umflată a bazei tulpinii; de pe hipocotil și mai rar de pe mezocotil se formează 3—7 rădăcini efemere numite *adventive primare* (trăiesc cîteva săptămîni);

c. după 10 zile de la germinare:

7. *Mezocotilul,* se află în prelungirea hipocotilului; în partea sa superioară este inserată, la nivelul primului nod, prima frunză (protofilă) numită frunză externă sau *coleoptil* ca un deget de mănușă; tot de la nivelul nodului pornesc rădăcinile adventive permanente;

8. *Mugurașul* (gemula) este alcătuit din cîteva primordii foliare apropiate, protejate de *coleoptil;* după un anumit timp, coleoptilul crapă sub presiunea creșterii mugurașului lăsîndu-l să iasă afară.

Singurul cotiledon rămîne închis în sămînță, tot timpul germinației, după care dispare (fig. 109, 110).

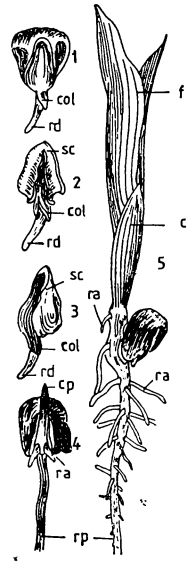


Fig. 109 — Etape în germinația la *Zea mays; 1* — apariția radiculei; *2* — embrionul separat de endosperm; *3* — același văzut din profil; *4* — la baza tulpiniței apar două rădăcini adventive; *5* — plantula de porumb; *col* — coleoriză; *cp* — coleoptil; *f* — frunză; *ra* — rădăcină adventivă; *rd* — radicală; *rp* — rădăcină principală; *sc* — scutelum.

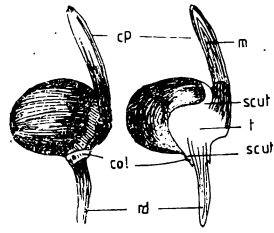


Fig. 110 — Cariopse de porumb germinate : *col* — coleoriză ; *cp* — coleoptil ; *m* — mugura (gemulă, plumulă) ; *rd* — radiculă ; *scut* — scutelum ; *t* — tulpiniță.

Plantula de grîu comun (Triticum aestivum L.)

a. după 2—3 zile de la germinare :

1. *Radicula* (rădăcina primară), străpunge *coleoriza* cînd aceasta atinge cîțiva milimetri ; este protejată la vîrf de piloriză ;

b. după 3 zile de la germinare :

2. *Zona piliferă*, acoperită de perișori absorbanți fini (500—1000 mm lungime) ;

3. *Coletul* sau baza rădăcinii — tulpinii este înconjurat de coleoriză, țesut de origine caulinară ;

4. *Hipocotilul*, este scurt, situat sub punctul de inserție a scutișorului ;

5. *Epicotilul*, alcătuit din internoduri foarte scurte, poartă în vîrf mugurele terminal. La fiecare nod se află cîte o frunzuliță, iar la nodurile inferioare cîte un mugura așezat între tulpină și frunzuliță din care poate lua naștere o axă ;

6. *Mezocotilul*, axa formată din succesiunea internodurilor alungite (în cazul însămînțării adînci) ;

7. *Coleoptilul*, ansamblul de noduri, internoduri, mugurași și frunzulițe, împreună cu vîrful vegetativ este acoperit de frunze și totul înfășurat în coleoptil (fig. 111, 112).

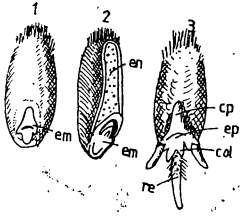


Fig. 111 — Etape în germinația cariopsei la *Triticum aestivum* : *col* — coleoriză ; *cp* — coleoptil ; *em* — embrion ; *en* — endosperm ; *re* — 3 rădăcini embrionare.

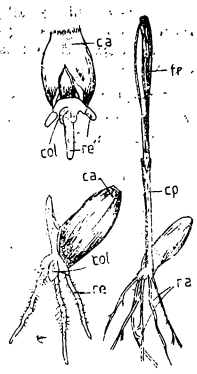


Fig. 112 — Germinația și plantula la *Triticum aestivum*: *ca* — cariopsa; *col* — coleoriza; *cp* — coleoptil; *fr* — frunză (nomofilă); *ra* — rădăcini adventive; *re* — rădăcini embrionare.

12.2. STRUCTURA PRIMARĂ A RĂDĂCINII

Organele vegetative au structură primară atunci cînd sînt alcătuite din țesuturi definitive primare, adică din țesuturi provenite direct din meristeme primare.

Toate plantele au, cel puțin în primele perioade ale vieții, o structură primară, după care structura lor se complică prin apariția țesuturilor secundare. Sînt și plante care au toată viața lor o structură primară — așa este cazul Pteridofitelor actuale și a majorității Monocotiledoneelor.

Structura primară a rădăcinii la Diocotyledoneae

Materiale necesare: rădăcini conservate în alcool de 70—80% sau proaspete de la grîușor (Ranunculus ficaria L.), piciorul cocoșului (Ranunculus sp.), calceu calului (Caltha palustris L.) ș.a., floroglucina, safranină și albastru Astra, Sudan III, HCl.

Pregătirea preparatelor:

1. Se fac numeroase secțiuni transversale și longitudinale prin rădăcină;

2. Se vor selecționa cele mai fine și se vor javeliza;

3. După spălare cu apă, de cîteva ori, secțiunile se colorează succesiv cu fluoroglucină + HCl (v. pag. 146) cu safranină + albastru Astra (v. pag. 154) și Sudan III (v. pag. 150);

Rezultatele colorării:

a. Cu floroglucină + HCl pereții lignificați se colorează în roșu-vișiniu; celelalte componente celulare nu se colorează. Coloratia nu se menține în preparate permanente;

b. Cu safranină + albastru Astra, pereții celulari nelignificați se colorează în albastru, cei lignificați în roșu, cei slab lignificați în violet;

c. Cu Sudan III, cutina, suberina din pereții celulari și grăsimile se colorează în roșu-gălbui intens.

Observații și comentarii

A. *Secțiune transversală prin rădăcina de Ranunculus ficaria L.*

Urmărind de la exterior la interior țesuturile rădăcinii, vom identifica:

1. *Rizoderma,* alcătuită dintr-un singur strat de celule, unele din ele transformate în peri absorbanți;

2. *Scoarța* este alcătuită din peste 12 straturi de celule, organizate în următoarele țesuturi:

a. *exoderma,* este alcătuită din unul — maximum două straturi de celule cu pereții ușor suberificați. În dreptul perișorilor absorbanți celulele exodermei au pereții nesuberificați; acestea se numesc celule de pasaj sau de trecere. Celulele de pasaj (trecere) permit trecerea apei absorbite și orientarea ei spre celulele scoarței și apoi spre cilindrul central;

b. *scoarța externă,* este reprezentată de cîteva straturi de celule parenchimatice cu spații intercelulare dispuse, alttern una față de alta;

c. *scoarța internă,* este formată din straturi celulare dispuse într-o ordine mai riguroasă decît celulele scoarței externe. În general celulele scoarței interne sînt mai mici decît ale scoarței externe;

d. *endoderma,* este unistratificată, alcătuită din celule cu îngroșări Caspary ligno-suberinice, pe pereții radiari și celule de pasaj (lipsite de îngroșări Caspary). Celulele cu îngroșări Caspary sînt situate în dreptul fasciculelor liberiene, cele de pasaj în dreptul fasciculelor lemnoase. Celulele de pasaj (trecere) înlesnesc trecerea apei din scoarță în fasciculele lemnoase din cilindrul central.

3. *Cilindrul central,* de tip *actinostel,* tetra-pentarh, este alcătuit din:

a. *periciclu,* țesut unistratificat, alcătuit din celule vii, care alternează cu celulele endodermei;

b. *fasciculele conducătoare lemnoase,* în număr de 4—5 sînt alcătuite fiecare din 2—3 vase protoxilematice (vase inelate), cu lumenul mic, spre periciclu și 3—5 vase metaxilematice (vase reticulate sau punctate) cu lumenul mai mare decît primele, dispuse spre centrul cilindrului central. Adesea metaxilemul ocupă tot mijlocul cilindrului central;

c. *fasciculele conducătoare liberiene,* în număr egal cu cel al fasciculelor lemnoase, sînt dispuse alternativ cu acestea în parenchimul fundamental. Corespunzător constituției fasciculelonr lemnoase, vom deosebi vase protofloematice, cu lumenul mic, cea mai mare parte și vase metafloematice, în proporție mai mică, cu lumenul ceva mai mare.

Țesutul liberian este alcătuit din tuburi ciuruite și parenchim liberian ;

d. *razele medulare primare*, sînt reprezentate de celulele parenchimatice dintre fasciculele conducătoare (fig. 113).

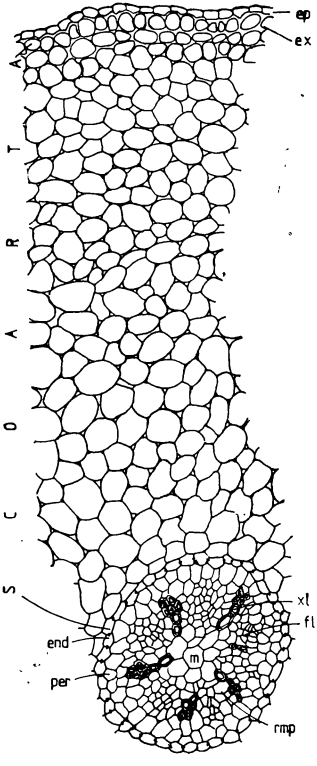


Fig. 113 — Secțiune transversală prin rădăcina de *Ranunculus ficaria* : *end* — endodermă ; *ep* — epidermă ; *ex* — exodermă ; *fl* — floem ; *per* — periciclu ; *rmp* — raze medulare primare ; *xl* — xilem

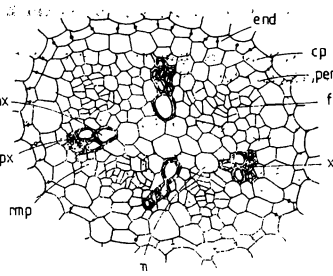


Fig. 114 — Cilindrul central mult mărit la *Ranunculus ficaria*: *cp* — celulă de pasaj; *end* — endoderma; *fl* — floem; *m* — parenchim medular; *mx* — metaxilem; *per* — periciclu; *px* — protoxilem; *rmp* — raze medulare primare; *xl* — *xilem*.

În centrul cilindrului central, la rădăcinile foarte tinere se află un țesut tînăr meristematic (fig. 114).

B. Secțiune longitudinală prin rădăcină de Ranunculus acer L.

Materiale necesare: rădăcini de piciorul cocoșului (Ranunculus acer L).

Pregătirea preparatelor:

1. Se fac secțiuni longitudinale (v. pag. 157) și se prelucrează ca mai sus.

Observații și comentarii

Urmărind succesiunea țesuturilor dintr-o rădăcină tînără, de la exterior la interior, vom identifica:

1. *Rizoderma*, unistratificată, cu peri absorbanți, unicelulari, fără cuticulă;

2. *Scoarța* este alcătuită din:

a. *exoderma*, unistratificată, din celule cu pereții ușor suberificați;

b. *scoarța externă*, este alcătuită din celule heterodiametrice, cu spații intercelulare mai mari sau mai mici;

c. *scoarța internă*, este reprezentată de celule mai mici decît cele ale scoarței externe, cu spații intercelulare mici sau lipsite complet de spații intercelulare;

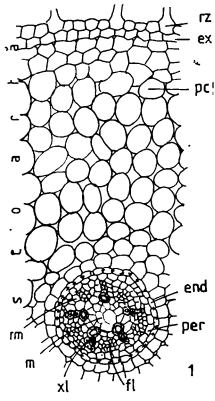
d. *endoderma*, unistratificată, fără spații intercelulare, cu pereții mai îngroșați decît ai restului scoarței;

3. *Cilindrul central:*

a. *periciclul*, unistratificat, alcătuit din celule parenchimatice cu pereții celulozici;

b. *fasciculul lemnos*, apare alcătuit din vase inelate (protoxilem), reticulate și punctate (metaxilem);

c. *fasciculul liberian*, este alcătuit din celule parenchimatice tinere (meristematice) (fig. 115).



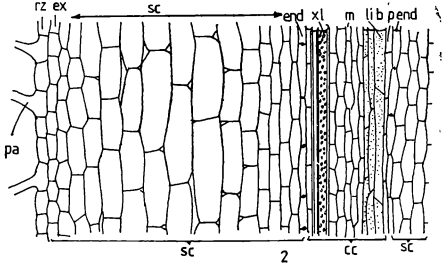


Fig. 115 Structura primară a rădăcinii la *Ranunculus repens*: *1* — secțiune transversală; 2 — secțiune longitudinală: *cc* — cilindru central; *end* — endoderma; *ex* — exoderma; *fl* (lib) — *floem*; *m* — parenchim medular meristematic; *pa* — păr absorbant; *pc* — parenchim cortical; *per* (p) — pericicliu; *rm* — raze medulare primare; *rz* — rizodermă; sc — scoarță; *xl* — xilem.

Materiale necesare : rădăcini conservate în alcool 70—80% de la stînjenel (Iris germanica L.), porumb (Zea mays L.), grîu (Triticum aestivum L), ceapă (Allium cepa L.) ş.a. floroglucină, safranină & albastru Astra, Sudan III (v. pag. 146—154).

Pregătirea preparatelor :

1. Se fac numeroase secţiuni transversale şi longitudinale prin rădăcină ;

2. Cele mai fine secţiuni se javelizează (v. pag.) ;

3. Se colorează succesiv cu floroglucină + HCl, Sudan III, safranină & albastru Astra (v. structura la Dicotiledonee).

Observaţii şi comentarii

12.2.1.1 Secţiune transversală prin rădăcina de Iris germanica I

De la exterior spre centru, se succed următoarele ţesuturi :

1. *Rizoderma,* unistratificată, alcătuită din celule cu pereţii celulozici ; unele celule sînt transformate în perişori absorbanţi ;

2. *Scoarţa,* este alcătuită din peste 12 straturi de celule :

a. *exoderma,* numită şi *cutis,* este alcătuită din 2—4 straturi de celule cu pereţii uşor suberificaţi. De obicei, în dreptul perişorilor absorbanţi celulele exodermei sînt nesuberificate ele alcătuind *celulele de pasaj* (de trecere).

De regulă celulele care alcătuiesc exoderma sînt lipsite de spaţii intercelulare ;

b. *scoarţa externă,* este reprezentată de celulele care urmează exodermei. Sînt celule parenchimatice, neregulat dispuse, cu spaţii intercelulare mai mari sau mai mici. Limita inferioară a scoarţei externe este marcată de dispunerea mai mult sau mai puţin regulată (radiară) a celulelor ;

c. *scoarţa internă,* este alcătuită dintr-un număr mai mic de straturi de celule decît scoarţa externă ; celulele scoarţei interne sînt ceva mai mici şi dispuse evident mai ordonat decît cele ale scoarţei externe ;

d. *endoderma,* este reprezentată de un singur strat de celule (în secţiune transversală !). Îngroşările *Caspary* apar în formă de potcoavă (caracter pentru Monocotiledonee !). Ca şi la Dicotiledonee, în dreptul fasciculelor lemnoase, celulele endodermei sînt lipsite de îngroşări Caspary — ele reprezintă celule de pasaj sau de trecere ;

3. *Cilindrul central* care urmează scoarţei este de tip actinostelic poliarh ;

a. *periciclul,* este alcătuit dintr-un singur strat de celule vii, parenchimatice dispuse în alternanţă cu cele ale endodermei. În rădăcinile mature, care nu mai formează radicele, celulele periciclului se lignifică ;

b. *fascicule conducătoare lemnoase,* în număr de 7—10 sînt alcătuite din 6—11 vase cu pereţii uniform îngroşaţi ; vasele mai mici dinspre periciclu reprezintă *protoxilemul,* cele mari (cu diametrul foarte

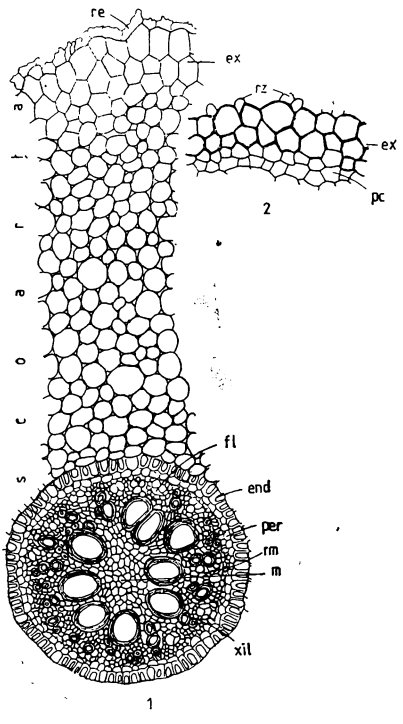


Fig. 116 — **Structura primară a rădăcinii la** *Iris germanica: 1* — sector cu structura rădăcinii; *2* — detaliu al exodermei: *end* — endoderma; *ex* — exoderma; *fl* — floem; *m* — parenchim medular; *pc* — parenchim cortical; *per* — periciclu; *re* — resturi de epidermă; *rz* — rizodermă; *xil* — xilem.

mare — *metaxilemul;* printre vasele de lemn se află celule ale parenchimului lemnos;

c. *fascicule conducătoare liberiene,* alternează cu cele lemnoase. Ele sînt alcătuite din proto- și metafloem. Primele elemente liberiene care apar, cele de protofloem, se deosebesc de cele care apar mai tîrziu prin lumenul mult mai mic; printre vasele liberiene se află celule ale parenchimului liberian;

d. *centrul cilindrului central* (măduva) este ocupat de un țesut mecanic, alcătuit din celule cu pereții lignificați (fig. 117).

Secțiune longitudinală prin rădăcina de Iris germanica L.

Urmărind în secțiuni longitudinale țesuturile rădăcinii de la centru la periferie vom observa :

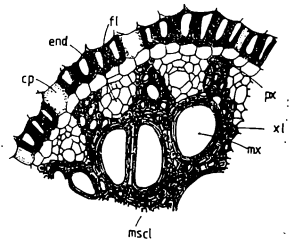


Fig. 117 — Iris germanica, detaliu din cilindrul central în secțiune transversală : *cp* — celulă de pasaj ; *end* — endodermă ; *fl* — floem ; *mscl* — măduvă sclerenchimatică ; *mx* — metaxilem ; *px* — protoxilem ; *xl* — xilem.

Cilindrul central, este alcătuit din elemente prozenchimatice, inclusiv traheide cu pereții lignificați care alcătuiesc un cordon central. Pereții celulari prezintă punctuațiuni simple sau în cruce ;

a. *metaxilemul,* este alcătuit din cîteva (1—3) vase punctate (trahee) lungi și cu lumenul foarte mare ;

b. *protoxilemul,* este constituit din traheide spiralate și inelate ;

c. *protofloemul,* este reprezentat de numeroase tuburi ciuruite cu lumenul mic, dispuse înspre periciclu ;

d. *metafloemul,* alcătuit din tuburi ciuruite cu lumenul mai mare.

Între țesuturile conducătoare lemnos și liberian se află țesut parenchimatic.

12.3. STRUCTURA SECUNDARĂ A RĂDĂCINII

Plantele perene dar și cele anuale au corpul alcătuit atît din țesuturi primare cît și secundare. Țesuturile secundare sînt generate de două meristeme secundare : *cambiul vascular* (cambiul libero-lemnos) și *felogenul* (cambiul subero-felodermic).

Cambiul vascular se formează întotdeauna în cilindrul central, la partea inferioară a fasciculelor liberiene și la cea externă a celor lemnoase ; mai întîi sub formă de arcuri de cerc apoi, prin racordarea acestora, capătă formă stelată.

Felogenul se formează întotdeauna în periciclu ; din activitatea lui rezultă felodermul și suberul care alcătuiesc împreună *periderma.*

Cu excepția ferigilor actuale și a majorității Monocotiledoneelor, toată viață cu structură primară, toate celelalte plante (Gimnosperme și Dicotiledoneele lemnoase și marea majoritate a celor ierboase) au

corpul format din țesuturi primare și secundare (în cea mai mare cantitate).

Materiale necesare : rădăcini (sau fragmente de 2,5—5 mm grosime) conservate în alcool 70—80% de la piciorul cocoșului tîrîtor (Ranunculus repens), grîușor (Ranunculus ficaria L.), calcea calului (Caltha palustris L.), dovleac (Cucurbita pepo L.), fasole (Phaseolus vulgaris), lucernă (Medicago sativa), bob (Faba vulgaris), sulfină (Medicago officinalis L.), tei (Tilia sp.), varză (Brassica oleracea L.) ș.a., floroglucină + HCl, safranină & albastru Astra, Sudan III și IV, Roșu de Congo și Orizoidină.

Pregătirea preparatelor

1. Se fac secțiuni transversale și longitudinale prin rădăcinile plantelor menționate ;
2. După selectare se javelizează (pînă la transparentizare) ;
3. Se spală de cîteva ori ;
4. Se colorează succesiv cu floroglucină + HCl apoi cu safranină & albastru Astra și Sudan III sau IV (v. pag. 146—154).
5. Secțiunile colorate se fixează în apă glicerinată sau gelatină glicerinată.

Observații și comentarii

Secțiunile care urmează sînt comentate, în continuare, de la periferie spre centru :

12.3.1. SECȚIUNE TRANSVERSALĂ PRIN RĂDĂCINA DE RANUNCULUS SP., ÇALTHA PALUSTRIS

Periderma (suber, felogen, feloderm), nu se formează în structura secundară de la aceste plante ;

1. *Epiderma,* unistratificată, este exfoliată din loc în loc ;
2. *Scoarța,* multistratificată, alcătuită din celule parenchimatice cu spații intercelulare aerifere mici sau sub formă de suprafețe de diferite mărimi situate între exodermă și endodermă.

a. *exoderma,* este 1—2 stratificată, alcătuită din celule strîns unite între ele, ușor îngroșate (suberificate). Ea preia rolul epidermei parțial exfoliate ;

b. *endoderma,* unistratificată, alcătuită din celule strîns unite între ele, cu pereții îngroșați aproape uniform ;

3. *Cilindrul central* este de tip tetra-pentarh :

a. *periciclul* este unistratificat, alcătuit din celule parenchimatice, mari, nucleate ; nucleele sînt dispuse pe pereții tangențiali interni ;

b. *parenchimul fundamental,* este reprezentat de razele medulare parenchimatice care separă elementele conducătoare primare lemnoase și liberiene ;

c. *țesutul conducător lemnos secundar.* Pe lîngă elementele primare cunoscute (4—5 fascicule lemnoase) apar acum, grație cambiului vascular, vase lemnoase cu lumenul mare, reprezentate de vase punctate și parenchim lemnos ;

d. *țesutul conducător liberian secundar,* este reprezentat de tuburi ciuruite cu plăci ciuruite simple, însoțite de celule anexe ;

e. *cambiul vascular* sau cambiul libero-lemnos, se formează din celulele parenchimului fundamental situate în partea inferioară a fasciculelor liberiene și la cea externă a celor lemnoase. Inițial cambiul este unistratificat, mai tîrziu bi- sau multistratificat și se prezintă sub formă de arcuri de cerc cu concavitățile în afară. Celulele pericliclice din dreptul protoxilemului se divid prin pereți tangențiali realizînd racordarea arcurilor cambiale ; acum cambiul vascular continuu capătă forma stelată. Centrul cilindrului central este ocupat de vasele lemnoase metaxilematice ale celor 4—5 fascicule lemnoase care se apropie formînd, la centru, un țesut lemnos compact. Din acest motiv, o măduvă tipică nu se formează (fig. 118).

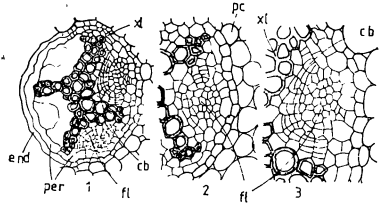


Fig. 118 — Structura secundară a rădăcinii la *Caltha palustris;* 1—3 etape în formarea cambiului vascular și a elementelor conducătoare secundare : *cb* — cambiu vascular ; *end* — endodermă ; *fl* — floem ; *pc* — parenchim cortical ; *per* — pericicliu ; *xl* — xilem.

12.4. STRUCTURA PRIMARĂ A TULPINII

Ca și în cazul rădăcinii, tulpina prezintă din punct de vedere al originii țesuturilor care o compun două tipuri structurale : structura primară și structura secundară.

Structura primară este edificată de țesuturi primare definitive, provenite din meristeme primare. *Structura secundară* este edificată de țesuturi secundare ; țesuturile primare descresc ca pondere pe măsură trecerii anilor astfel încît în cele din urmă ele devin din ce în ce mai puțin reprezentate și în cele din urmă sînt aproape total eliminate. Țesuturile secundare care devin predominante și în cele din urmă totalitare sînt generate de două meristeme secundare : *cambiul vascular* și *felogenul.*

12.4.1. STRUCTURA PRIMARĂ A TULPINII LA DICOTYLEDONEAE

Materiale necesare : fragmente de tulpină, conservate în alcool 70—80% sau proaspete de la piciorul cocoșului tîrîtor (Ranunculus rapens L.), dovleac (Cucurbita pepo L.), floarea soarelui (Helianthus annuus L.) ș.a., floroglucină + HCl, safranină și albastru Astra, Sudan III.

Pregătirea preparatelor

1. Se fac secțiuni transversale și longitudinale cît mai subțiri, prin tulpinile de analizat (tulpinile mai groase se secționează la început, în lung ; fișiile rezultate se secționează transversal) ;

2. Se vor selecta cele mai subțiri secțiuni și se vor javeliza ;

3. Se spală cu apă de cîteva ori ;

4. Secțiunile se colorează succesiv, unele secțiuni cu floroglucină + HCl (v. pag. 146), altele cu safraninâ + albastru Astra (v. pag. 154) și altele cu Sudan III (v. pag. 150) ;

5. Se montează în glicerină.

Rezultatele colorării :

a. Cu floroglucină + HCl, pereții lignificați se colorează în roșu-vișiniu ; celelalte componente celulare nu se colorează. Coloratia nu se menține în preparate permanente ;

b. Cu safraninâ + albastru Astra, pereții celulari nelignificați se colorează în albastru, cei lignificați în roșu, cei slab lignificați în violet ;

c. Cu Sudan III, cutina, suberina din pereții celulari și grăsimile se colorează în roșu-gălbui intens.

Observații și comentarii

12.4.1.1. Structura primară a tulpinii la Ranunculus repens

A. *Secțiune transversală prin tulpina de Ranunculus repens L.*

De la exterior spre interior se succed următoarele țesuturi :

1. *Epiderma,* alcătuită dintr-un singur strat de celule strîns unite între ele, acoperite de o cuticulă fină ; din loc în loc se observă stomate ;

2. *Scoarța,* spre deosebire de cea de la rădăcină, foarte groasă, este alcătuită doar din cîteva straturi de celule. Primul strat subepidermic este colenchimatic, celelalte sînt parenchimatice, între ele cu spații intercelulare, uneori foarte mari ;

a. *endoderma și pericicluI,* lipsesc ; limita externă a cilindrului central este socotită linia imaginară care unește la exterior fasciculele libero-lemnoase ;

b. *Cilintrul central,* este de tip eustel : fasciculele (în număr variabil) sînt dispuse regulat pe un singur cerc, într-un țesut parenchimatic fundamental ;

c. *fasciculele libero-lemnoase* sînt de tip colateral deschis, avînd între liber și lemn cambiu intrafascicular ; toate fasciculele libero-lemnoase sînt înconjurate de o coroană sclerenchimatică ; mai bine dezvoltată la polul superior al fasciculei unde ia forma unei calote. Coroana sclerenchimatică este întreruptă, în dreptul cambiului intrafascicular de un țesut (fișie) alcătuit din celule parenchimatice cu pereții subțiri. Acest țesut (fișie) se numește de *pasaj* sau de trecere, deoarece ușurează trecerea (pătrunderea) substanțelor în fasciculul libero-lemnos ;

d. *cordonul liberian,* este dispus spre exterior și alcătuit din tuburi ciuruite însoțite de celule anexe și parenchim liberian (mai ales periferia fasciculului). Vasele ciuruite au lumenul mai mare decît celulele anexe ; acestea din urmă, se recunosc după conținutul lor bogat în protoplasmă. Elementele care alcătuiesc liberul sînt strîns unite între ele fără a lăsa spații intercelulare. Cele situate în partea superioară, ime-

diat sub calota sclerenchimatică, au lumenul mai mic — ele formează *protofloemul*. Elementele liberului, cu lumen mare, de sub protofloem, alcătuiesc *metafloemul*.

e. *cambiul intrafascicular*, constă din cîteva straturi de celule turtite, dispuse radiar și fără spații intercelulare;

f. *cordonul lemnos*, este dispus spre interior și alcătuit din vase lemnoase (trahee și traheide) și parenchim lemnos. Vasele lemnoase (inelate și spiralate) cu lumenul redus, situate la partea inferioară a cordonului lemnos, alcătuiesc *protoxilemul*. Fiind astfel dispus se zice că are poziție *endarhă* spre deosebire de rădăcină unde este *exarh*; următoarele vase, spre exterior (spre cambiul intrafascicular) au lumenul din ce în ce mai mare, ele sînt vase cu punctuațiuni oblice și în sfîrșit, vase cu punctuațiuni simple (vase punctate). Aceste elemente conducătoare lemnoase, care apar mai tîrziu în ontogenia plantei, cu diametru mare, alcătuiesc *metaxilemul*;

g. *lacuna medulară*, în centrul cilindrului central, în locul țesutului medular, se află o lacună medulară formată pe cale rexigenă (fig. 119).

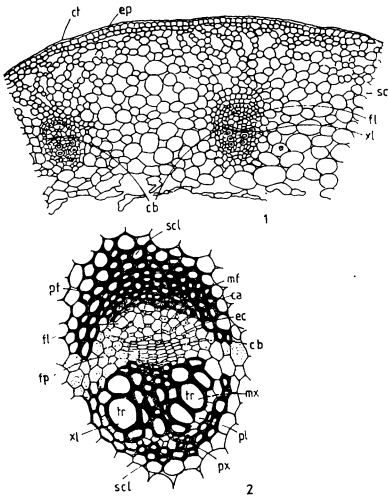


Fig. 119 — Structura primară a tulpinii la *Ranunculus repens*: 1 fragment structural din tulpină; 2 — fasciculul libero-lemnos colateral deschis: *ca* — celule anexe; *cb* — cambiu intrafascicular; *ct* — cuticulă; *ec* — elemente curuite; *ep* — epidermă; *fl* — floem; *fp* — fișie de pasaj; *mf* — metafloem; *mx* — metaxilem; *pf* — protofloem; *pl* — parenchim lemnos; *px* — protoxilem; *sc* — scoarță; *scl* — sclerenchim; *tr* — trahee; *xl* — xilem.

B. *Secțiune longitudinală prin tulpina de Ranunculus repens L.*

Numai într-o secțiune longitudinală ne putem da seama de forma și natura fiecărui element lemnos în parte:

Elementele lemnului (xilemului).

a. *protoxilemul,* este reprezentat de vase inelate și spiralate ;

b. *metaxilemul,* este reprezentat de vase reticulate și punctate ;

c. *parenchimul lemnos,* constă din celule scurte, heterodiametrice, intercalate între elementele proto- și metaxilemului ;

Cambiul libero-lemnos intrafascicular, este reprezentat de cîteva straturi de celule mult alungite și înguste, dispuse radiar ;

Elementele liberului (floemului).

a. *tuburi ciuruite și celule anexe,* sînt elemente alungite cu pereții transversali ciuruiți ; fiecare tub ciuruit este însoțit de cîte o celulă anexă. De fiecare articul de tub ciuruit sînt alipite două celule anexe. Elementele liberului sînt flancate (dispuse la periferie) de celule ale parenchimului liberian ;

Coroana sclerenchimatică, flanchează fasciculul libero-lemnos fiind alcătuită din celule alungite și înguste, cu pereții uniform îngroșați (fig. 120).

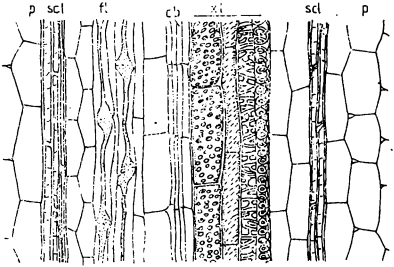


Fig. 120 — Secțiune longitudinală printr-un fascicul libero-lemnos colateral deschis la *Ranunculus repens : cb* — cambiu intrafascicular ; *fl* — floem ; *p* — parenchim cortical ; *scl* — sclerenchim ; *xl* — xilem.

12.4.2. STRUCTURA PRIMARĂ A TULPINII LA MONOCOTYLEDONEAE

Spre deosebire de Dicotiledonee, care au atît structură primară cît și secundară, marea majoritate a Monocotiledoneelor, au toată viața o structură primară.

Materiale necesare: fragmente de tulpină, conservate în alcool, de la porumb (Zea mays L.), grîu comun (Triticum aestivum L.), lăcrămioară (Convallaria majalis L.), floroglucină + HCl, albastru Astra.

Pregătirea preparatelor

1. Se fac secțiuni transversale și longitudinale prin fragmentele de tulpină ale plantelor menționate ;

2. Se aleg cele mai subțiri secțiuni și se javelizează (3—7 minute) ;

3. Se spală de cîteva ori cu apă (prin barbotare cu ajutorul unei pipete ;

4. Se colorează, unele secțiuni cu floroglucină altele cu albastru Astra (v. pag. 146, 154).

Țesuturile se colorează după cum urmează :

a. Cu floroglucină + HCl, pereții lignificați se colorează în roșu-vișiniu ; celelalte componente celulare nu se colorează ;

b. Cu safraninâ + albastru Astra, pereții celulari nelignificați se colorează în albastru, cei lignificați în roșu, cei slab lignificați în violet.

Observații și comentarii.

A. *Secțiune transversală prin tulpina de porumb (Zea mays L.)*

De la periferie spre centru se succed următoarele țesuturi :

1. *Epiderma,* alcătuită dintr-un singur strat de celule mici și cu pereții îngroșați, cei externi ușor bombați. Din loc în loc se observă stomate ; epiderma este acoperită de o cuticulă evidentă.

2. *Scoarța externă,* este foarte îngustă, alcătuită din 1—3 straturi de celule cu pereții îngroșați (lignificați) ; ea este cunoscută și sub denumirea de hipodermă ;

a. *scoarța internă,* este alcătuită din 2—3 straturi de celule parenchimatice, dispuse imediat sub hipodermă. Este de menționat că atît scoarța externă cît și cea internă sînt de natură parenchimatică în porțiunile de tulpină acoperite de tecile frunzelor ;

c. *Cilindrul central,* este de tip atactostelic ; limita cilindrului central este socotită linia imaginară care unește la exterior fasciculele conducătoare libero-lemnoase de tip colateral închis. De formă ovală, fasciculele au la poli cîte un arc sau uneori un inel de sclerenchim. La limita dintre floem și xilem, inelul este întrerupt de celule parenchimatice numite *celule de pasaj.*

În cilindrul central se întîlnesc mai multe fascicule conducătoare cele periferice sînt mai mici și mai dense decît cele centrale care sînt mai mari și mai rare ; toate sînt amplasate în parenchimul fundamental al cilindrului central :

a. *cordonul liberian* (floematic) este alcătuit din tuburi ciuruite poligonale, cu lumenul mare, însoțite de celule anexe cu lumenul mic bogate în conținut celular și din parenchim liberian. Sub arcul de sclerenchim se găsesc cîteva tuburi ciuruite strivite, care alcătuiesc *protofloemul,* restul floemului alcătuiește *metafloemul ;*

b. *cordonul lemnos* (xilematic), constă din două vase mari metaxilematice, dispuse lateral, spre liber, de o parte și de alta a planului de simetrie al fasciculului. Vasele lemnoase sînt legate între ele de parenchimul lemnos. Sub ultimul vas protoxilematic se află o lacună protoxilematică schizo-lizigenă aeriferă (fig. 121).

B. *Secțiune longitudinală prin tulpină*

De la dreapta la stînga secțiunii se disting următoarele țesuturi :

1. *Parenchim fundamental,* alcătuit din celule cu spații mici intercelulare ;

2. *Teaca sclerenchimatică perifasciculară,* constă din celule cu pereții uniform îngroșați, impregnați cu lignină ;

3. *Floemul,* este reprezentat de tuburi ciuruite însoțite de celule anexe și de parenchim liberian ;

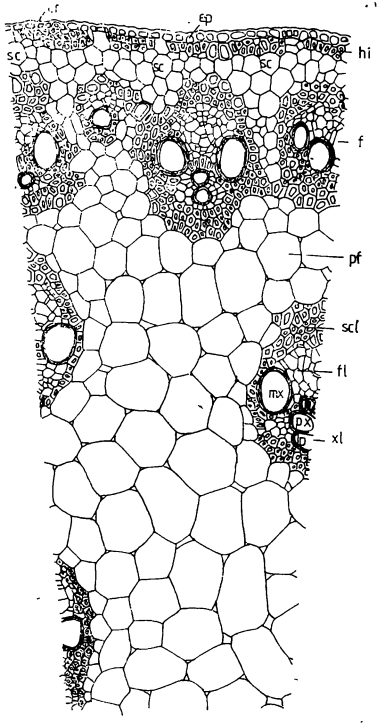


Fig. 121 — Secțiune transversală prin tulpina de *Zea mays* : *ct* — cuticulă ; *ep* — epidermă ; *f* — floem ; *hi* — hipodermă ; *lp* — lacună protoxilematică ; *pf* — parenchim fundamental ; *sc* — scoarță ; *scl* — sclerenchim ; *xl* — xilem.

4. ***Xilemul***, este alcătuit din vase punctate, spiralate și inelate, legate de celulele parenchimului lemnos. Lîngă vasul inelat se află lacuna protoxilematică (**fig. 122**).

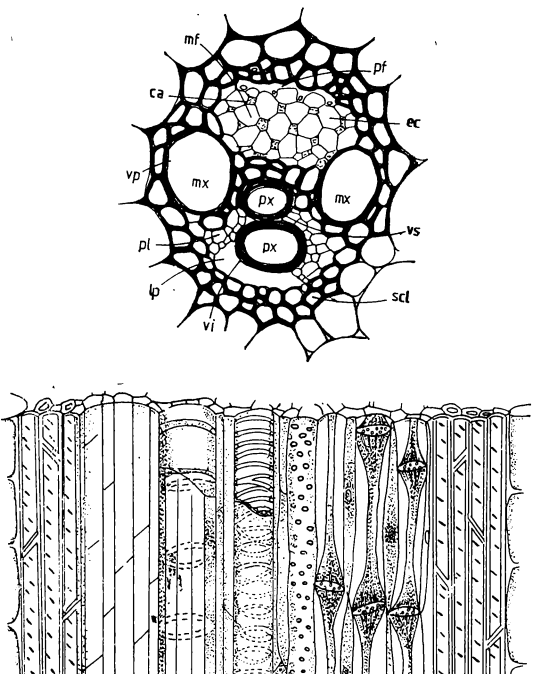


Fig. 122 — Organizarea structurală a unui fascicul conducător libero-lemnos colateral închis la *Zea mays*: *ca* — celule anexe; *ec* — elemente ciuruite; *lp* — lacună protoxilematică; *mf* — metafloem; *mx* — metaxilem; *pf* — protofloem; *pfd* — parenchim fundamental; *pl* — parenchim lemnos; *px* — protoxilem; *scl* — sclerenchim; *vi* — vas inelat; *vp* — vas punctat; *vs* — vas spiralat.

Observații

Fasciculele libero-lemnoase periferice sînt complet înglobate în sclerenchim ; de multe ori aceste fascicule au numai metaxilem prin urmare sînt lipsite de lacună protoxilematică.

12.5. STRUCTURA SECUNDARĂ A TULPINII

Ca și în cazul rădăcinii, tulpina are fie numai o structură primară (Pteridofitele actuale și Monocotiledoneele) precum și fanerogamele efemere, fie că au inițial structură primară după care, țesuturile respective se complică, în urma apariției țesuturile secundare.

Diferențierea țesuturilor secundare este determinată de cele două meristeme secundare, cambiul vascular și felogenul (cambiul suberofelodermic).

Cambiul vascular se formează în cilindrul central, în urma remeristematizării parenchimului fundamental ; el generează liber și lemn secundare.

Felogenul se formează, în urma remeristematizării unor țesuturi definitive situate în afara cilindrului central ; el generează suber și felodermă.

Țesuturile secundare determină creșterea în grosime a tulpinilor respective și dispunerea concentrică a țesuturilor conducătoare.

Materiale necesare : fragmente de tulpină de floarea soarelui (Helianthus annuus L.), dalie (Dahlia variabilis L.) ramuri de 1—3 ani de tei (Tilia sp.) conservate în alcool 70—80%, floroglucină + HCl, safranină & albastru Astra, reactiv Genevez (roșu de Congo și Crizoidină).

Pregătirea preparatelor

1. Se fac secțiuni transversale și longitudinale prin tulpină (ramuri) plantelor enumerate ;

1 a. Dacă materialul este prea dur, fragmentele de tulpină se introduc în prealabil în trietilenglicol + o picătură de HCl, la 60°C timp de 24 ore ;

2. Secțiunile selectate se javelizează ;

3. Se colorează succesiv cu floroglucină + HCl și safranină & albastru Astra ;

3 a. Secțiunile prin ramurile de tei se pot colora și cu reactivul Genevez ;

12.5.1. SECȚIUNE TRANSVERSALĂ PRIN TULPINA DE HELIANTHUS ANNUUS

Observații și comentarii

De la exterior spre centrul secțiunii se observă următoarele țesuturi :

1. *Epiderma,* unistratificată, alcătuită din celule mici, strîns unite între ele, delimitate de o cuticulă evidentă ; din loc în loc prezintă peri ;

2. *Scoarța,* este pluristratificată, constituită din celule heteromorfe, dispuse în două zone :

a. *scoarța externă,* este reprezentată de un colenchim angular, 2-3-stratificat ;

b. *scoarța internă*, este parenchimatică, alcătuită din celule heterodiametrice. Din loc în loc se observă canale secretoare ;

c. *teaca amiliferă*, este ultimul strat al scoarței ; este alcătuită dintr-un singur strat de celule amilifere ;

3. *Cilindrul central*, este de tip eustelic ; fasciculele conducătoare libero-lemnoase de tip colateral deschis, sînt de mărimi și vîrste diferite; fasciculele mari sînt alcătuite din elemente primare și secundare în timp ce fasciculele mici sînt formate secundar, din activitatea cambiului interfascicular (fig. 123).

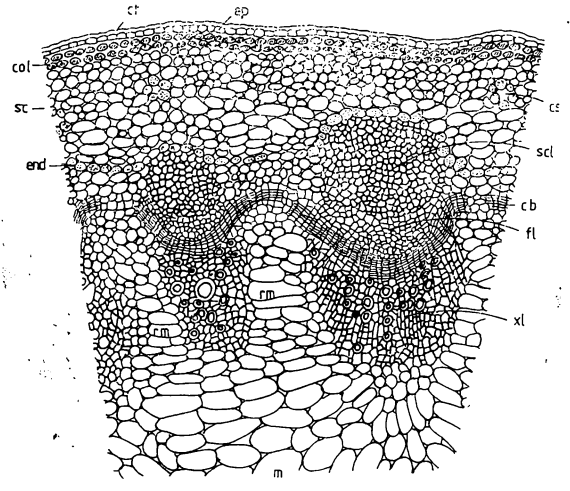


Fig. 123. Structura secundară a tulpinii la *Helianthus annuus* : *cb* — cambiu libero-lemnos ; *col* — colenchim ; *cs* — canale secretoare ; *end* — endoderma ; *ep* — epiderma ; *fl* — floem ; *m* — măduva ; *rm* — raze medulare ; *sc* — scoarța ; *scl* — sclerenchim ; *xl* — xilem.

a. *cordonul floematic*, este dispus spre exterior și alcătuit din vase ciuruite însoțite de celule anexe și parenchim liberian. Protofloemul este situat la polul apical al liberului. Sub acesta se află metafloemul, alcătuit din elemente conducătoare cu lumenul mai mare decît cele ale protofloemului. În apropierea cambiului intrafascicular se află elemente ciuruite secundare ;

b. *cambiul libero-lemnos intrafascicular*, caracterizează fasciculele de tip colateral deschis ; secundar din reactivarea meristematică a parenchimului razelor medulare primare se formează cambiul interfascicular ce se racordează curînd la cel intrafascicular, rezultînd un cambiu libero-lemnos circular continuu. Acesta va genera elemente floematice și xilematice secundare în cadrul fasciculelor primare mari și noi fascicule libero-lemnoase de origine secundară mai mici decît primele ;

c. *cordonul xilematic*, completează fasciculul libero-lemnos. El este reprezentat de vase lemnoase secundare imediat în apropierea cambiului intrafascicular ; urmează vase lemnoase primare, metaxilematice cu lumenul mare, apoi vase protoxilematice cu lumenul mic. Acestea din urmă alcătuiesc polul inferior al fasciculului libero-lemnos. Elementele lemnoase sînt legate între ele de celule ale parenchimului lemnos.

Atît fasciculele mici (alcătuite din elemente secundare) cît și cele mari (alcătuite atît din elemente primare cît și secundare) prezintă calote sclerenchimatice deasupra cordonului liberian ;

d. *parenchimul medular*, din centrul cilindrului central este alcătuit din celule de forme și mărimi diferite ;

4. *Razele medulare secundare*, alcătuite din celule parenchimatice sînt generate de cambiul interfascicular ; ele sînt reprezentate de fișiile de parenchim dintre fasciculele libero-lemnoase (fig. 124).

12.5.2. SECȚIUNE TRANSVERSALĂ PRIN TULPINA DE TILIA SP.

Observații și comentarii

Vom prezenta succesiunea de țesuturi de la exterior spre cilindrul central într-o ramură de 4 ani :

1. *Epiderma*, unistratificată, acoperită de o cuticulă groasă este fragmentată și în cea mai mare parte exfoliată ;

2. *Scoarța*, este reprezentată atît de țesuturi secundare cît și primare ;

a. *suberul*, este țesutul alcătuit din cîteva straturi de celule cu pereții brun-maronii, dispuse unele sub altele fără să lase spații intercelulare;

b. *felogenul*, situat imediat sub țesutul descris ; reprezintă meristemul secundar care generează centrifugal suber și centripetal feloderm ;

c. *felodermul*, este format din celule parenchimatice cloroplastice, ușor colenchimatizate sau reprezentat chiar de un colenchim tabular ; el reprezintă *scoarța secundară*. Suberul, felogenul și felodermul formează laolaltă *periderma ;*

d. *scoarța primară*, este reprezentată de cîteva straturi de celule puternic turtite și dezorganizate, pe cale de dispariție. Ultimul strat al scoarței primare poartă numele de *teacă amiliferă*. Aceasta este greu de reperat pe secțiunile prin ramurile de 1 an, pe cele de 4 ani dispare complet (fig. 125).

3. *Cilindrul central*, de tip eustelic constă din țesuturi conducătoare dispuse concentric și țesuturi neconducătoare :

a. *pericicluI* este greu de identificat chiar pe secțiunile de 1 an ; celule ale pericicIului sînt considerate doar cele situate deasupra fasciculelor liberiene care sînt sclerificate ; pe secțiunile de 4 ani dispare complet ;

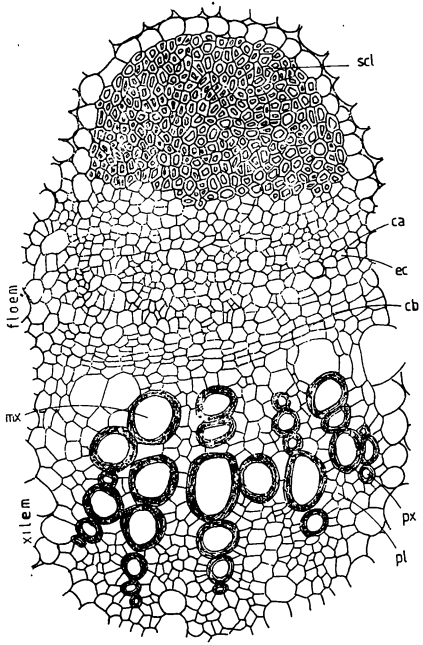


Fig. 124. Fascicul libero-lemnos colateral deschis la *Helianthus annuus*: *ca* — celule anexe; *cb* — cambiu libero-lemnos intrafascicular; *ec* — elemente ciuruite; *mx* — metaxilem; *pl* — parenchim lemnos; *px* — protoxilem; *scl* — sclerenchim.

b. *floemul primar* în secțiunile de 1 an se prezintă sub formă de insule de celule puternic aplatizate și dezorganizate; pe secțiunile de 4 ani dispare;

c. *floemul secundar* este fragmentat sub forma de trapeze (cu baza mare spre cambiul vascular) de către razele medulare primare, denumite, în această zonă, *parenchim de dilatare*. În formațiunile trapezoi-

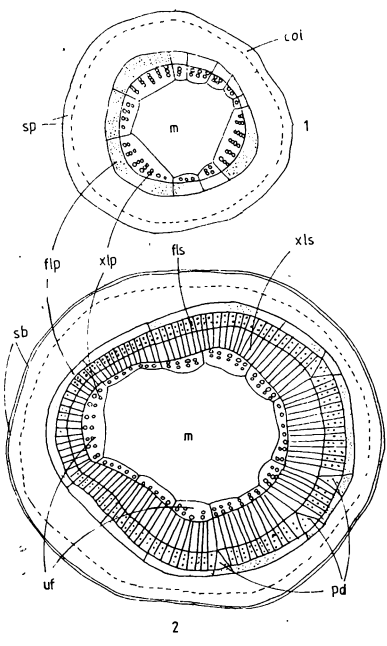


Fig. 125 — Secțiuni transversale schematice prin tulpina de *Tilia* sp.: *1* — la începutul creșterii secundare în grosime; *2* — după 1 an: *col* — colenchim; *flp* — floem primar; *fls* — floem secundar; *m* — măduva; *pd* — parenchim de dilatare; *sb* suber; *sp* scoarță primară; *xl* — xilem primar; *xls* — xilem secundar; *uf* — urme foliare.

dale floematice se observă pachete de fibre liberiene (sclerenchimatice), tuburi ciuruite însoțite de celule anexe și parenchim liberian;

d. *cambiul vascular*, meristem secundar, generator de floem și xilem secundare, este alcătuit din cîteva straturi de celule aplatizate, dispuse radiar;

e. *xilemul secundar*, este dispus în cercuri concentrice numite *inele anuale;* un singur inel în ramura de 1 an și 4 în cea de 4 ani. În acest ultim caz inelele din diferiți ani sînt delimitate de cîteva straturi de celule complet lignificate, ce aparțin cambiilor din anii precedenți. Inelul de xilem cel mai exterior reprezintă lemnul cel mai tînăr, din ultimul an de vegetație (din anul în care a fost secționată ramura). Inelele care

se succed centripetal, după primul inel, sînt formate în anii anteriori; ultimul inel de xilem a fost generat de cambiul vascular în primul an de creștere secundară în grosime.

Xilemul secundar este alcătuit din trahee cu diametrul mai mare sau mai mic, dispuse la baza inelului, din parenchim lemnos și fibre lemnoase (fig. 126).

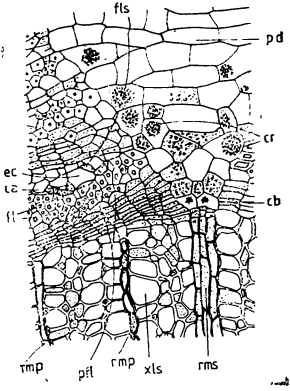


Fig. 126 — Tilia sp., detaliu structural: *ca* — celule anexe; *cb* — cambiu vascular libero-lemnos; *cr* — cristale de oxalat de calciu (druze); *ec* — elemente ciuruite; *fls* — floem secundar; *fl* — fibre liberiene sclerenchimatice; *pd* — parenchim de dilatare; *pfl* — parenchim floemic; *rmp* — raze medulare secundare, *rms* — raze medulare primare; *xls* — xilem secundar.

În cadrul unui inel anual traheele cu lumenul mare formate la baza inelului, împreună cu parenchimul lemnos respectiv, alcătuiesc *lemnul de primăvară;* traheele cu lumenul mic, formate mai ales spre limita superioară a inelului, reprezintă *lemnul de vară — toamnă;*

f. *xilemul primar* se află sub forma unui inel întrerupt (de razele medulare primare) în jurul măduvei;

4. *Măduva,* este alcătuită din țesut parenchimatic; în unele celule medulare se formează druze de oxalat de calciu, în altele mucilagii;

5. *Razele medulare,* de natură parenchimatică sînt:

a. *primare* și

b. *secundare.*

Razele medulare primare sînt 2-3-stratificate, alcătuite din celule alungite în sens radiar; ele leagă măduva de scoarță. În zona liberului secundar razele medulare primare se dilată formînd parenchimul de dilatare, separînd liberul în fragmente trapezoidale;

Razele medulare secundare, de diferite vîrste, leagă între ele lemnul și liberul secundare de diferite vîrste (fig. 127).

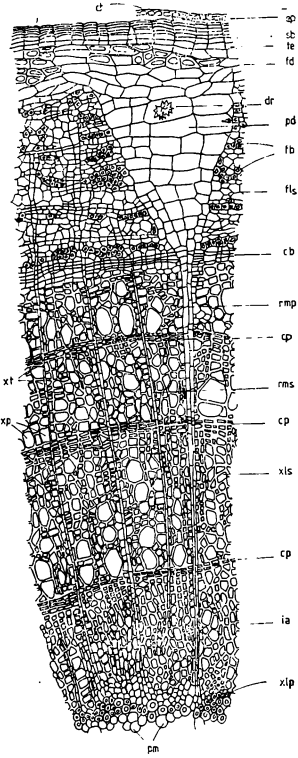


Fig. 127 — Secțiune transversală prin tulpina de 4 ani de la *Tilia* sp.: *cb* — cambiu vascular liberolemnos; *cp* — cambii precedente lignificate; *ct* — cuticulă; *dr* — druze de oxalat de calciu; *ep* — epiderma; *fb* — fibre liberiene; *fl* — felogen; *fd* — feloderm; *fls* — floem secundar; *ia* — 4 inele anuale; *pd* — parenchim de dilatare; *pm* — parenchim medular; *rmp* — raze medulare primare; *rms* — raze medulare secundare; *xlp* — xilem primar; *xls* — xilem secundar; *xp* — xilem de primăvară; *xt* — xilem de vară—toamnă.

12.6. STRUCTURA FRUNZEI

În cele mai multe cazuri frunzele au o structură primară, fiind alcătuite numai din țesuturi de origine primară.

Materiale necesare: fragmente de lamină decupate din treimea superioară a frunzei, conservate în alcool etilic 75—80%, de al pin (Pinus

sp.), fag (Fagus sylvatica L.), tutun (Nicotiana tabacum L.), levănțică (Lavandula sp.), apă de Javelle, hematoxilină alaunată (hemalaun) după Mayer, floroglucină + HCl, H_2SO_4 conc., gelatină glicerinată.

Pregătirea preparatelor

1. Se fac secțiuni transversale foarte fine cu ajutorul unei lame de ras noi și se introduc imediat în apă (de robinet) ;

2. Secțiunile se javelizează pînă la transparentizare ;

3. Se spală bine cu apă ;

4. Se colorează cu hematoxilină alaunată d. Mayer, 3—5 minute (se va evita supracolorarea) ;

5. Se spală cu apă distilată, apoi se transferă în apă de robinet care se schimbă de 3—4 ori ;

6. Se includ în apă distilată (glicerină, sau gelatină glicerinată) și se acoperă cu lamela ; coloranția se păstrează bine un timp îndelungat.

Țesuturile se colorează după cum urmează :

a. pereții celulari nelignificați apar albastru intens pînă la violet ;

b. lamelele mijlocii de la colenchim ies în relief ;

c. nucleele apar negru-albastre ;

d. cristalele de oxalat de calciu în H_2SO_4 conc. se transformă în aglomerări de cristale aciculare fine de gips ;

e. pereții celulari lignificați se colorează, cu floroglucină + HCl în roșu-vișiniu.

12.6.1. SECȚIUNE TRANSVERSALĂ PRIN FRUNZA DE PINUS NIGRA L

Observații și comentarii :

1. După dispoziția țesuturilor, frunza de la pin este de tip omogen ;

2. *Epiderma,* unistratificată, delimitată de o cuticulă evidentă, din loc în loc cu stomate ; celulele ei au pereții puternic îngroșați, astfel că lumenul lor apare de forma literei H sau X.

Epiderma superioară delimitează partea plană, în timp ce epiderma inferioară formează partea convexă a frunzei ;

3. *Hipoderma,* sclerificată este alcătuită din 1—3 straturi de celule cu pereții îngroșați, legate între ele prin punctuațiuni ; lumenul celular este poligonal ;

4. *Parenchimul asimilator,* este alcătuit din celule cloroplastice, cu pereții cutați ;

5. *Endoderma,* unistratificată, delimitează cilindrul central în care se află două fascicule libero-lemnoase de tip colateral deschis, înconjurate de parenchimul și traheidele de transfuziune ;

6. *Parenchimul de transfuziune,* este alcătuit din celule vii, cu citoplasmă parietală și sistem vacuolar bine dezvoltat, lipsite de cloroplaste;

7. *Traheidele de transfuziune,* sînt celule lipsite de viață în pereții cărora se află punctuațiuni areolate ; parenchimul și traheidele de transfuziune le denumim împreună *„măduvă" mixtă* sau *parenchim mixt perivascular ;*

8. *Țesutul conducător* (nervura), este organizat în două fascicule libero-lemnoase colateral deschise, dispuse în parenchimul mixt.

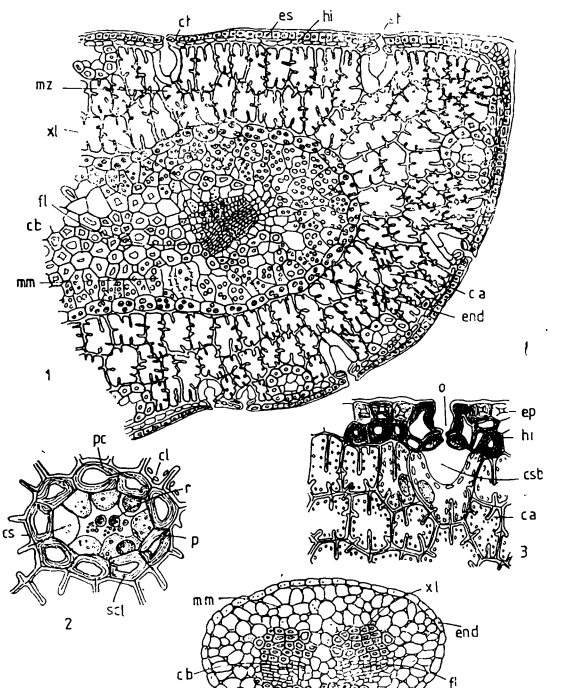


Fig. 128 — Organizarea structurală a frunzei la *Pinus* sp.: *1* — secțiune transversală prin frunză; *2* — canal secretor; *3* — detaliu structural mult mărit cuprinzînd epiderma și o parte din mezofil; *4* — țesutul conducător libero-lemnos dispus în măduva mixtă (parenchim traheal de transfuziune; *ca* — celule asimilatoare cutate; *cb* — cambiu intrafascicular; *cl* — cloroplaste; *cs* — celule secretoare; *csb* — cameră substomatică; *ct* — cuticulă; *end* — endodermă; *ep* — epiderma; *es* — epiderma superioară; *fl* — floem; *hi* — hipoderma; *mm* — măduvă mixtă; *mz* — mezofil; *o* — ostiolă; *p* — punctuațiune; *pc* — perete celular lignificat; *r* — răşină; *sc* — sclerenchim; *st* — stomată; *xl* — xilem.

Un fascicul conducător este alcătuit dintr-un cordon liberian orientat spre partea convexă a frunzei și unul lemnos dispus spre partea plană a acestuia. Între liber și lemn se află cambiul intrafascicular.

a. *cordoanele liberiene*, din cele două fascicule, sînt delimitate, pe fața lor externă de celule sclerenchimatice în timp ce cordoanele lemnoase se sprijină pe celule cu pereții ușor suberificați ;

Floemul este alcătuit din celule ciuruite și parenchim liberian, iar *xilemul* din traheide de calibru mic (protoxilem) sau mai mare (metaxilem) ;

9. *Canale rezinifere*, se găsesc în număr variabil (4—6) în mezofilul asimilator. Fiecare canal este înconjurat de un strat de scleride cu pereții lignificați uniform. Urmează un al doilea strat de celule secretoare de rășină care căptușește cavitatea canalului. Aceste celule secretoare de rășină sînt bogate în citoplasmă și au nuclee mari. În lumenul canalului se acumulează rășină (fig. 128).

O structură asemănătoare întîlnim la *Pinus sylvestris L.*

12.6.2. SECȚIUNE TANSVERSALĂ PRIN FRUNZA DE FAGUS SYLVATICA

Observații și comentarii

1. *După dispoziția țesuturilor, frunza de la fag este de tip dorsiventral ;*

2. *Epiderma superioară*, este alcătuită din celule heterodiametrice cu pereții celulozici, subțiri ; la exterior se observă o cuticulă evidentă ;

Mezofilul este reprezentat de următoarele țesuturi :

3. *Țesutul palisadic*, este alcătuit din celule prozenchimatice, numite *palisadice*, dispuse perpendicular pe epidermă. Celulele palisadice sînt bogate în cloroplaste și astfel dispuse încît între ele se creează spații intercelulare mai mici sau mai mari ; numărul straturilor palisadice variază pe lățimea laminei (fig. 129).

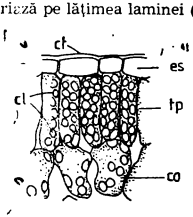


Fig. 129. Fagus sylvatica, detaliu al mezofilului : *co*—celule colectoare ; *cl*—cloroplaste ; *ct*—cuticula ; *es*—epiderma superioară ; *tp*—țesut palisadic.

4. *Țesutul lacunar* (lacunos, spongios), alcătuit din cîteva straturi celulare completează mezofilul laminei ; este reprezentat de celule de diferite forme, dispuse neordonat ; între ele se formează lacune aerifere de diferite dimensiuni, de unde și numele pe care îl poartă ;

5. *Epiderma inferioară*, ca și cea superioară este alcătuită din celule heterodiametrice, dar ceva mai mici decît cele ale epidermei superioare. Din loc în loc se observă stomate cu camere substomatice evidente ;

6. *Țesutul conducător foliar* este organizat în fascicule libero-lemnoase colateral închise ; la rîndul lor, acestea alcătuiesc nervurile :

a. *cordonul lemnos* (xilemul) este orientat întotdeauna spre epiderma superioară (fața ventrală a frunzei). Este alcătuit din traheide și trahee inelate și spiralate dispuse radiar, legate între ele de celule ale parenchimului lemnos ; **xilemul din frunză este** organizat în *protoxilem* dispus spre polul superior al fasciculei și *metaxilem* dispus spre cel inferior (spre cordonul liberian). În acest caz spunem că xilemul are o creștere *dorsipetală ;*

b. *cordonul liberian* (floemul), situat imediat sub xilem, spre epiderma inferioară (fața dorsală a frunzei): Este alcătuit din tuburi ciuruite, parenchim liberian și fibre sclerenchimatice. Acestea din urmă fragmentează liberul în mai multe pachete distincte. Spre deosebire de xilem, floemul din frunză se dezvoltă și se maturează *centripetal.*

7. *Sclerenchimul perifascicular* (teacă, coroană perifasciculară), este alcătuit din celule sclerenchimatice, cu pereții lignificați. Grosimea lui, în jurul fasciculelor este variabilă ;

8. *Calote colenchimatice polare.* La cei doi poli ai fasciculelor conducătoare mari se află cîte o calotă de colenchim tabulo-angular ; calota de la polul inferior al fasciculelor este ceva mai mare decît cea superioară. La polii fasciculelor mici se pot vedea adesea idioblaste cu druze de oxalat de calciu (fig. 130).

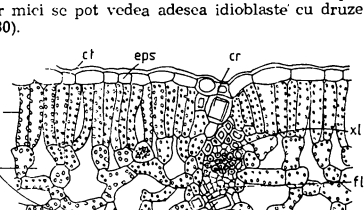


Fig. 130. Secțiune transversală prin frunza de *Fagus sylvatica : cr*—cristale de oxalat de calciu ; *ct*—cuticula ; *epi*—epiderma inferioară ; *eps*—epiderma superioară ; *fl*—floem ; *st*—stomată ; *tl*—țesut lacunar (spongios) ; *tp*—țesut palisadic ; *xl*—xilem ;

Precizare : nervurile groase (principală și secundară) sînt alcătuite la baza laminei, din mai multe fascicule libero-lemnoase. Acestea scad treptat ca număr spre vîrful, respectiv marginile laminei frunzei.

12.6.3. SECȚIUNE TRANSVERSALĂ PRIN FRUNZA DE LAVANDULA SP.

Observații și comentarii :

1. După dispoziția țesuturilor, frunza este amfistomatică, de tip dorsiventral ;

2. *Epiderma superioară,* este alcătuită dintr-un singur strat de celule izomorfe, întrerupte de stomate și peri (simpli și glandulari). Pereții tangențiali externi sînt evident bombați și acoperiți de cuticulă.

Mezofilul este reprezentat de două țesuturi :

2. *Țesutul palisadic,* este format dintr-un singur strat de celule palisadice cloroplastice, de tip prozenchimatic, dispuse perpendicular pe epiderma superioară. Între celulele palisadice se află spații intercelulare de diferite mărimi ; sub stomate se află camere substomatice ;

3. *Țesutul lacunar* (lacunos, spongios), este format din celule heteromorfe astfel dispuse încît între ele rămîn lacune aerifere de dimensiuni diferite. Pe lîngă spațiile menționate, în dreptul stomatelor din epiderma inferioară se află lacune aerifere.

Celulele conțin cloroplaste în număr mai mic decît cele palisadice.

4. *Epiderma inferioară*, este ca și cea superioară unistratificată, alcătuită din celule strîns unite între ele. Din loc în loc epiderma este întreruptă de stomate și peri glandulari și peri tectori ramificați.

5. *Țesutul conducător* este organizat în fascicule libero-lemnoase colateral închise. Analizînd nervura principală observăm :

a. *cordonul lemnos* (xilemul) este orientat spre epiderma superioară ; este alcătuit din trahee și traheide înelate și spiralate dispuse radiar, unite între ele de parenchim lemnos ;

b. *cordonul liberian* (floemul), se află imediat sub xilem, fiind orientat spre epiderma inferioară. Este alcătuit din tuburi ciuruite însoțite de celule anexe și parenchim liberian ;

Parenchimul perifascicular este țesutul parenchimatic care înconjoară fasciculul libero-lemnos ;

6. *Calote colenchimatice polare*. Sînt două pachete de celule colenchimatice dispuse la cei doi poli ai fasciculei libero-lemnoase. Polul inferior al fasciculei împreună cu calota colenchimatică respectivă determină o proieminență evidentă a frunzei (fig. 131).

12.6.4. SECȚIUNE TRANSVERSALĂ PRIN FRUNZA DE ZEA MAYS L

Observații și comentarii.

1. După dispoziția țesuturilor frunza de porumb este amfistomatică, de tip omogen ;

2. *Epiderma superioară*, este alcătuită din celule heterodiametrice, strîns unite între ele. Din loc în loc se observă stomate, peri și celule buliforme (acvifere) ; sub stomate se evidențiază clar, camere substomatice ;

Mezofilul, omogen este alcătuit din celule asimilatoare uniforme, bogate în cloroplaste, cu intercelulare în general mici ;

4. *Epiderma inferioară*, este asemănătoare cu cea superioară cu deosebirea că este lipsită de celule buliforme. Ambele epiderme sînt delimitate de cîte o cuticulă evidentă ;

5. *Țesutul conducător*, este organizat în fascicule libero-lemnoase de tip colateral închis și dispuse în mezofil sub formă de nervuri.

Fasciculele libero-lemnoase care reprezintă nervurile secundare sînt mai mici ; ele sînt dispuse în partea mediană a mezofilului. Fasciculul care reprezintă nervura mediană este mult mai mare, determinînd proieminarea frunzei pe partea dorsală, în dreptul acestuia :

a. *cordonul lemnos* (xilemul), este reprezentat de cîteva vase protoxilematice cu dispoziție ventrală (fața superioară) și două vase mari de metaxilem de o parte și de alta a fasciculului. Vasele lemnoase sînt legate între ele de celule ale parenchimului lemnos. Dezvoltarea lemnului în frunză se face *dorsipetal*.

b. *cordonul liberian* (floemul), situat imediat sub cel lemnos este alcătuit din elemente ciuruite și parenchim liberian ;

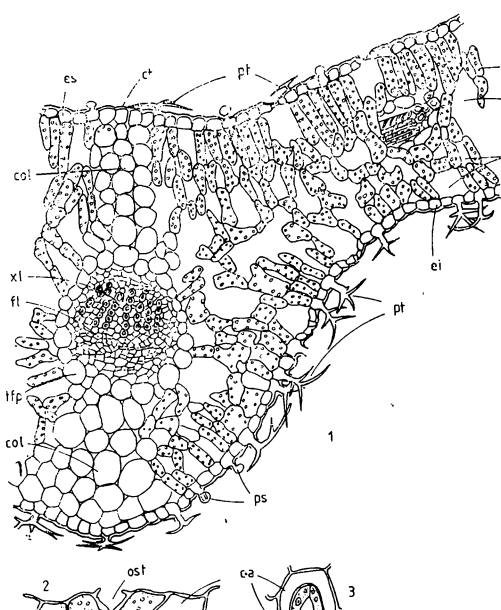


Fig. 131 — Secțiune transversală prin fruza de *Lavandula* sp.: *1* — fragment structural; *2* — stomata în secțiune transversală; *3* — stomata în secțiune tangențială; *ca* — celule anexe; *col* — colenchim; *cst* — celule stomatice; *ct* — cuticula; *ei* — epiderma inferioară; *es* — epiderma superioară; *fl* — floem; *ost* — ostiolă; *ps* — peri secretori; *pt* — peri tectori; *tc* — țesut conducător; *tfp* — teacă fasciculară parenchimatică; *tl* — țesut lacunar (spongios); *tp* — țesut palisadic.

6. *Țesutul perifascicular*, este reprezentat în cazul fasciculelor mari de un cordon sclerenchimatic unistratificat pe părțile laterale, pluristratificat numai la polii fasciculelor. În acest ultim caz sclerencsimul atinge

cele două epiderme. Fasciculele mici sînt înconjurate de teci parenchimatice asimilatoare, perifasciculare (fig. 132 a).

Precizare : celulele buliforme (3—5 celule) sînt situate numai în epiderma superioară, în dreptul fasciculelor mici (nervurile secundare) ; stomatele sînt de tip halteriform (fig. 132 b).

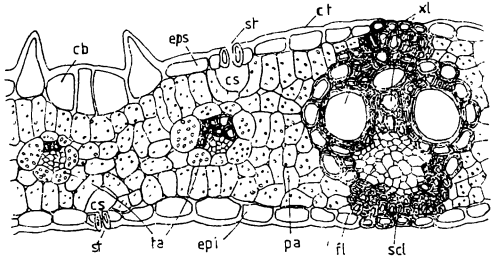


Fig. 132 a — Secțiune transversală prin frunza de *Zea mays: cb* — celule buliforme ; *cs* — cameră substomatică ; *ct* — cuticulă ; *epi* — epiderma inferioara ; *eps* — epiderma superioară ; *fl* — floem ; *pa* — parenchim asimilator ; *scl* — sclerenchim ; *st* — stomate ; *ta* — teacă asimilatoare ; *xl* — xilem.

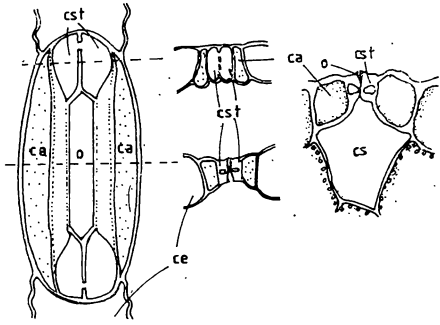


Fig. 132 b. Organizarea structurală a stomatei la *Zea mays : ca* — celule anexe ; *ce* — celule epidermale ; *cs* — cameră substomatică ; *cst* — celule stomatice ; *o* — ostiolă.

13. EXPERIENȚE DE FIZIOLOGIE VEGETALĂ

13.1. FIZIOLOGIA CELULEI

13.1.1. OSMOZA PRIN MEMBRANE PERMEABILE

Membranele permeabile permit trecerea, atît a apei cît și a substanței dizolvate în apă. Acest lucru se poate demonstra cu ajutorul osmometrului Dutrochet. El se compune dintr-un tub de sticlă în formă de pîlnie (fig. 133) care are fixată la partea mai largă o membrană de intestin animal degresată și umectată.

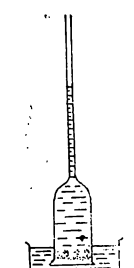


Fig. 133 — Osmometrul Dutrochet.

Modul de lucru. În interiorul osmometrului se toarnă o soluție osmotic activă (de exemplu zaharoză 10% sau NaCl 20%). Apoi se spală la exterior osmometrul de resturile de soluție, după care se introduce cu membrana nîtr-un vas cu apă distilată, care are pe fund un grătar de sticlă sau de lemn. Se notează nivelul lichidului din osmometru, după un timp observîndu-se că acesta crește datorită pătrunderii mai rapide a moleculelor de apă de la exterior la interior decît a ieșirii moleculelor de substanță de la interior spre exterior. Aceasta înseamnă că endosmoza se desfășoară cu o viteză mai mare decît exosmoza. Se observă apoi o scădere a nivelului lichidului din osmometru datorită

micșorării în timp a diferenței de concentrație între mediul intern și mediul extern pentru ca la egalizarea concentrațiilor nivelul lichidului din osmometru să rămînă constant.

13.1.2. OSMOZA PRIN MEMBRANE SEMIPERMEABILE

Membranele semipermeabile permit trecerea apei și opresc trecerea substanței dizolvate în apă. O astfel de membrană semipermeabilă se poate obține în urma reacției dintre ferocianura de potasiu și sulfatul de cupru. Precipitatul de ferocianură de cupru ce se formează constituie o membrană semipermeabilă de precipitare.

$$K_4Fe(CN)_6 + 2CuSO_4 \rightarrow Cu_2Fe(CN)_6 + 2K_2SO_4$$

Modul de lucru. Într-o eprubetă sînt introduși cîțiva mililitri de soluție de $CuSO_4$ 1,5 N, peste care este pus un cristal de ferocianură de potasiu. Ca urmare a diozlvării treptate a cristalului de ferocianură de potasiu se formează o membrană semipermeabilă de ferocianură de cupru care înconjoară cristalul de ferocianură de potasiu. Apare astfel o formațiune asemănătoare unei celule denumită „celula artificală a lui Traube". Între membrană și cristal se formează o soluție concentrată de ferocianură de potasiu care este osmotic activă și atrage apa din soluția de sulfat de cupru. Ca urmare, volumul „celulei" va crește, membrana se va rupe, iar soluțiile venind din nou în contact vor reface membrana. În urma acestor ruperi și refaceri repetate ale membranei în eprubetă va lua naștere o formațiune asemănătoare cu o algă brună.

Membrane semipermeabile rezistente se pot obține în pereții unor vase de lut sau de porțelan poros.

În interiorul unui vas poros este introdusă soluția de ferocianură de potasiu 0,5 N (211,17 g $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$/l), după care acesta se introduce într-un alt vas mai mare care conține o soluție normală (N) de $CuSO_4$ (124,86 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ sau 79,82 g $CuSO_4$/l) unde este ținut timp de 20 de minute. În pereții vasului poros se formează o membrană semipermeabilă de ferocianură de cupru rezistentă (rezistența fiindu-i conferită de peretele vasului poros).

Se scoate vasul poros din soluția de sulfat de cupru, se varsă soluția de ferocianură de potasiu și se clătește cu apă distilată. Cu ajutorul acestui vas poros, care conține în pereți o membrană semipermeabilă rezistentă, se poate construi un osmometru Pfeffer (fig. 134), cu care putem determina presiunea osmotică a unei soluții oarecare. Acest osmometru poate funcționa 2—3 zile. Înainte de fiecare întrebuințare membrana trebuei refăcută după ce, în prealabil, porii vasului au fost spălați cu acid clorhidric timp de 15—20 de minute și apoi cu apă distilată.

13.1.3. PLASMOLIZA ȘI DEPLASMOLIZA

Plasmoliza reprezintă micșorarea volumului protoplastului dintr-o celulă vie, în urma unei sustrageri de apă din el și mai ales din sucul celular, de către o soluție externă hipertonică, sustragere în urma căreia plasmalema începe să se desprindă de peretele celular, mai întîi la unghiurile celulei (pasmoliză incipientă), apoi și în alte zone (plasmoliză concavă), iar în final aproape total (plasmoliză convexă).

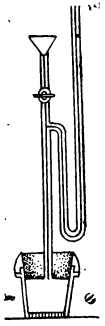


Fig. 134 — Osmometrul Pfeffer.

Deplasmoliza are loc prin intervenția unui curent endosmotic care reface turgescența celulei.

Modul de lucru. Se ia un fragment din epiderma superioară a frunzei modificate din bulbul de ceapă și se așează pe o lamă microscopică într-o picătură de KNO_3 1M (101,11 g KNO_3/l), peste care se pune o lamelă. Acest preparat se examinează la microscop.

În soluția hipertonică de KNO_3 celulele epidermei de ceapă pierd apă, vacuolele se contractă și protoplasma se desprinde de peretele celulozic. În primele 2—3 minute se va observa plasmoliza concavă apoi în următoarele 10—15 minute apare plasmoliza convexă (fig. 135).

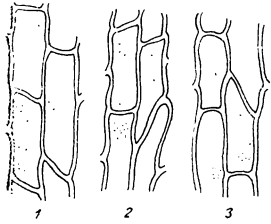


Fig. 135 — Tipuri de plasmoliză în ce-
1 — p. inițială ; 2 — p. concavă ;
3 — p. convexă.

Deplasmoliza se obține prin înlocuirea soluției de KNO_3 cu apă. Pentru aceasta se pune o picătură de apă pe una din laturile lamelei, în timp ce pe latura opusă se absoarbe soluția de KNO_3 cu ajutorul unei hîrtii de filtru sau sugativă. Sucul celular fiind concentrat, absoarbe apa, iar protoplastul revine treptat la forma inițială — redevine turgescent.

13.1.4. MĂSURAREA PRESIUNII OSMOTICE CU AJUTORUL SOLUȚIILOR IZOTONICE

Cunoașterea valorii presiunii osmotice a țesuturilor vegetale prezintă atît o importanță teoretică cît și una practică, oferindu-ne indicii asupra gradului de aprovizionare cu apă a plantelor. Acesta este unul din indicii fiziologice folosiți în stabilirea momentului de udare în cazul culturilor irigate.

Datorită faptului că determinările se fac pe celule intacte acest procedeu este unul din cele mai corecte prezentînd și avantajul de a fi foarte rapid.

Modul de lucru. Ca plamolitic se folosește o soluție de zaharoză ale cărei molecule pătrund greu în celule, iar ca material biologic epiderma inferioară a frunzelor modificate ale bulbuului de ceapă.

Pornind de la o soluție de zaharoză 1M se pregătesc soluții cu concentrațiile de 0,46 ; 0.48 : 0,50 ; 0,51 ; 0,52 ; 0,53 M, care se iau în volume de cîte 10 ml și se pun fiecare în cîte o sticlă de ceas. Se desprind apoi segmente de epidermă de pe aceeași paralelă și de pe aceiași frunză modificată de la bulbul de ceapă și se introduc cîte două în fiecare sticlă de ceas. Se acoperă sticlele de ceas pentru a împiedica evaporația iar pe capace se va nota concentrațiile soluțiilor după care se lasă în repaus timp de o oră. După acest timp se examinează la microscop segmentele de epidermă pentru a se stabili în care din soluții se observă începutul de plasmoliză, marcat prin desprinderea protoplastului numai în colțurile (unghiurile) celulelor. Pentru a considera că pe un anumit segment de epidermă se întîlnește începutul de plasmoliză trebuie ca aproximativ 50% din celule să arate acest început. Soluția respectivă se consideră ca fiind izotonică cu sucul vacuolar. Soluțiile în care nu se observă nici un început de plasmoliză sînt hipotonice față de sucul vacuolar iar cele în care se produce o plasmoliză concavă sau convexă sînt considerate hipertonice.

Cunoscînd faptul că 1 ml de zaharoză solvit într-un litru de apă dezvoltă o presiune osmotică de 22,41 atmosfere, printr-o regulă de trei simplă se poate calcula valoarea presiunii osmotice a sucului vacuolar al celulelor cu care se lucrează.

Exemplu : Dacă 1 mol zaharoză dezvoltă . . . 22,41 atm

$$\frac{0{,}50 \text{ mol} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \quad X}{X = \frac{22{,}41 \times 0{,}50}{1} = 11{,}2 \text{ atm}}$$

13.1.5. MĂSURAREA FORȚEI DE SUCȚIUNE A CELULELOR DIN PARENCHIMUL TUBERCULULUI DE CARTOF (METODA PRINGSHEIM)

Apa pătrunde în celule fiind atrasă de o forță denumită de A. Ursprung și G. Blum forță de sucțiune. Ea reprezintă diferența existentă la un moment dat între presuinea osmotică (Po) și presiunea de turgescență (T) a celulelor. S = Po — T.

Principiul metodei constă în măsurarea lungimii unor segmente dintr-un tubercul de cartof, care se introduc în soluții de zaharoză de

concentrații diferite. Soluția în care lungimea segmentului de tubercul rămîne neschimbată are presiunea osmotică egală cu forța de sucțiune a celulelor.

Modul de lucru. Pornind de la o soluței de zaharoză 1 M se pregătesc volumetric o serie de 5 concentrații : 0,2 M ; 0,4 M ; 0,6 M ; 0,8 M ; 1 M, și apă distilată. (De exemplu pentru soluția 0,2 M se iau 2 ml soluție de zaharoză 1 M peste care se adaugă 8 ml de apă distilată). Se introduce fiecare soluție în cîte o eprubetă pe care se notează concentrația și se agită bine pentru omogenizarea soluțiilor. Cu ajutorul unui perforator se scot 6 segmente de aceeași lungime (50 mm) dintr-un tubercul de cartof introducînd cîte unul în fiecare eprubetă. Segmentele se lasă în contact cu soluțiile de zaharoză minimum două ore. Apoi se scot pe rînd segmentele de tubercul din eprubete, se tamponează ușor cu o hîrtie de filtru sau sugativă după care se măsoară din nou cu ajutorul unei rigle. Se constată că unele segmente au crescut în lungime (cele din soluțiile mai diluate), altele au scăzut (cele din soluțiile mai concentrate). Se caută să se determine soluția în care lungimea segmentului a rămas constantă — adică soluția izotonică. Dacă în nici una din soluții lungimea segmentului de tubercul de cartof nu a rămas constantă soluția izotonică va fi reprezentată de media celor două concentrații succesive în care în prima lungimea segmentului a crescut puțin iar în cea de a doua a scăzut puțin.

Creșterea sau scăderea în lungime a segmentelor este determinată de valorile mai mici sau mai mari ale presiunii osmotice a soluțiilor față de valoarea forței de sucțiune a celulelor. În eprubetele în care lungimea segmentelor a crescut forța de sucțiune a celulelor a depășit valoarea presiunii osmotice a soluțiilor celulelor absorbind apă din soluția de zaharoză în timp ce în eprubetele în care lungimea segmentelor a scăzut presiunea osmotică a soluțiilor a depășit valoarea forței de sucțiune a celulelor soluțiile absorbind apa din celule. În eprubeta în care segmentul a rămas la lungimea inițială forța de sucțiune a celulelor este egală cu presiunea osmotică a soluție.

Cunoscînd concentrația acestei soluții se calculează valoarea forței de secțiune cu ajutorul relației : $S = C.R.T.$ în care :

S = forța de reacțiune a materialului vegetal

C = concentrația soluției, izotonice

T = temperatura absolută (= 273 + temperatura de lucru din laborator).

13.1.6. DETERMINAREA FORȚEI DE SUCȚIUNE A ȚESUTURILOR VEGETALE PRIN METODA CURENȚILOR (METODA SARDAKOV)

Principiul metodei este același ca și în experiența anterioară cu deosebirea că modificarea concentrațiilor soluțiilor se evidențiază prin compararea densității soluției inițiale cu densitatea aceleiași soluții în care s-a ținut un țesut vegetal.

Modul de lucru. Se ia un șir de eprubete cu cîte 10 ml soluții de zaharoză în concentrații succesive de la 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ... și pînă la 1 M. Se ia un al doilea șir paralel de eprubete și se pune în fiecare eprubetă cîte 2 ml din soluțiile inițiale.

În eprubetele din acest al doilea șir se introduc cîte 10 rondele de frunză suprapuse ținute pe o bucată de scîndură. Se va avea grijă ca să nu rămînă lipite de pereții eprubetelor ci ele să fie în contact cu soluția. După 20–30 de minute de la introducerea rondelelor în fiecare din aceste eprubete se introduce cîte un cristal de albastru de metilen și se agită eprubetele al căror conținut se colorează în albastru. Apoi cu cîte o pipetă Pasteur se ia din fiecare eprubetă cîte o coloană de 14—15 cm de soluție colorată, se introduce pipeta în eprubeta corespunzătoare (ca concentrație) din primul șir pînă la mijlocul coloanei de soluție și se dă drumul cu atenție unei picături. Se scoate încet pipeta pentru a nu provoca curenți și se urmărește picătura colorată lăsată în eprubeta din primul șir.

La eprubetele cu soluții hipotonice se vor observa curenții descendenți (picătura colorată coboară) datorită concentrării acestor soluții din care celulele țesutului vegetal, cu forță de sucțiune mai mare decît presiunea osmotică a soluției, au absorbit apă. La eprubetele cu concentrații mari, hipertonice se vor observa curenți ascendenți (picătura urcă) datorită diluării acestor soluții în urma absorbției apei din țesuturi, ele avînd presiunea osmotică mai mare decît forța de sucțiune a țesutului vegetal.

În eprubeta în care picătura colorată rămîne pe loc (nu se observă nici un fel de curenți) înseamnă că soluția este izotonică cu sucul vacuolar din țesut.

Pornind de la valoarea concentrației acestei soluții se calculează valoarea forței de sucțiune a celulelor țesutului după formula :

$$S = RTCi$$ în care :

R = 0,0821 (constanta gazelor perfecte).
T = temperatura în scară absolută (= 273 + temperatura de lucru din laborator).
C = concentrația soluției izotonice (în moli).
i = coeficientul izotonic (în cazul zaharozei = 1).

13.2. REGIMUL DE APĂ AL PLANTELOR

13.2.1. LOCALIZAREA ABSORBȚIEI APEI PRIN RĂDĂCINI

La plantele vasculare terestre, ale căror rădăcini prezintă peri absorbanți, absorbția apei are loc mai ales la acest nivel.

Modul de lucru. Pentru a stabili zona prin care se face absorbția apei de către rădăcini se iau două plantule ce prezintă o rădăciniță seminală lungă și se introduc în două pahare Berzelius în următoarele poziții : una în așa fel încît zona perișorilor absorbanți să fie în apă (un strat gros de apă și unul subțire de ulei) iar cea de a doua cu zona perișorilor absorbanți în ulei și vîrful rădăcinii în apă (un strat subțire de apă și unul gros de ulei) așa după cum se poate observa în fig. 136. După un interval de timp se va constata că plantula al cărei peri absorbanți au stat în stratul de ulei se va veșteji demonstrîndu-se astfel că absorbția apei se face prin perii absorbanți.

13.2.2. DETERMINAREA CANTITĂȚII DE APĂ ABSORBITĂ PRIN RĂDĂCINI

Intensitatea absorbției apei de către rădăcinile plantelor se determină cu ajutorul potometrelor (recipiente de sticlă umplute cu apă și

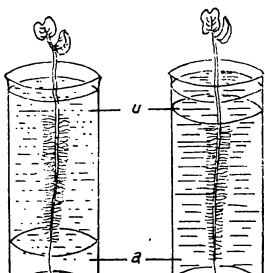


Fig. 136 — Localizarea absorbției apei la nivelul rădăcinii.

prevăzute cu un tub gradat pe care se citește cantitatea de apă absorbită de rădăcinile plantei fixate în interiorul lor).

Modul de lucru. Se umple potometrul cu apă și se fixează în dopul lui planta de experiență după ce în prealabil au fost spălate rădăcinile pentru îndepărtarea pământului rămas pe ele. Se introduc rădăcinile plantei în apa din potometru care se astupă cu dopul prin care trece planta. Dacă potometrul este prevăzut cu pîlnie și robinet (fig. 137 se

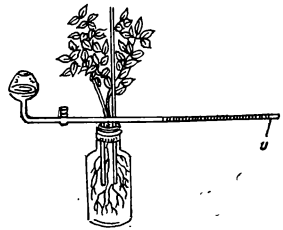


Fig. 137 — Potometrul Vesque : u — picătură de ulei.

aduce coloana de apă din tubul gradat la zero prin deschiderea robinetului iar dacă nu, se notează nivelul apei din tubul gradat. Apoi se introduce în capătul tubului gradat o picătură de ulei pentru a împiedica evaporarea. Se lasă instalația în repaus la temperatură constantă iar după o oră se citește pe tubul gradat volumul de apă absorbit de rădăcini.

13.2.3. ABSORBȚIA APEI PRIN FRUNZE

Deși plantele aeriene au drept organ specializat în absorbția apei rădăcinile, ele au posibiltatea de a absorbi apa și prin frunze.

Modul de lucru. Frunzele cu care se experimentează se lasă cîteva ore la temperatura camerei ca să se ofilească puțin, după care li se

parafinează suprafața de secțiune a pețiolului, se cîntărește la balanța analitică și se scufundă într-un cristalizator cu apă.

După o oră se scoate frunza din apă, se tamponează cu hîrtie de filtru pentru a înlătura apa de pe suprafața ei și se cîntărește din nou. Făcîndu-se diferența între greutatea obținută și greutatea inițială se determină cantitatea de apă absorbită de frunză. Se raportează cantitatea de apă absorbită fie la 100 g frunze proaspete fie la unitatea de suprafață (dm^2) pentru intervalul de timp de o oră. În cazul raportării la unitatea de suprafață, suprafața foliară se determină prin metoda mulajelor.

13.2.4. DETERMINAREA INTENSITĂȚII TRANSPIRAȚIEI CU AJUTORUL PATOMETRELOR

Transpirația reprezintă procesul de eliminare a apei de către plante sub formă de vapori. Intensitatea transpirației plantelor variază de la o specie la alta și chiar de la un organ la altul în funcție de structura lor anatomică.

La plantele superioare organul cel mai bine adaptat îndeplinirii acestei funcții este frunza datorită grosimii ei relativ mici, suprafeței mari de contact cu aerul atmosferic și prezenței stomatelor.

Modul de lucru. Se fixează planta sau ramura, căreia vrem să-i determinăm intensitatea transpirației, în orificiul dopului potometrului și se introduce dopul în potometrul umplut cu apă pînă la refuz, în așa fel ca să nu rămînă bule de aer în interiorul său (fig. 138). Prin introducerea dopului, excesul de apă trece în tubul gradat al potometrului.

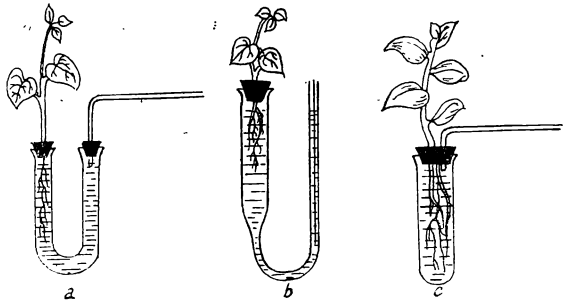


Fig. 138 — Diferite tipuri de potometre : a — potometrul Mangin ; b — potometrul Pfeffer ; c — potometru confecționat dintr-o eprubetă.

Se etanșează apoi dopul potometrului cu ceară moale sau parafină topită verificînd apoi etanșeitatea instalației (dacă potometrul este etanș apa nu trebuie să se scurgă prin tubul gradat al potometrului la înclinarea

acestuia și nici să se deplaseze în acest tub la ținerea lui în poziție normală timp de un minut).

După această verificare se introduce în tubul gradat o picătură de ulei pentru a împiedica evaporarea apei din tub și se lasă instalația la temperatura camerei. Planta pierde apă prin transpirație, apa pierdută fiind înlocuită prin absorbția unei cantități egale de apă din potometru, fapt evidențiat prin deplasarea meniscului din tubul gradat înspre potometru.

Notînd nivelul apei din tubul gradat la începutul experienței și după o oră de repaus la temperatura camerei se află volumul de apă absorbit de către plantă pentru a înlocui apa pierdută prin transpirație.

Rezultatele obținute prin această metodă nu sînt exacte deoarece în timpul montării experienței se pot astupa vasele de lemn ale ramurei și ca urmare se îngreunează absorbția apei care nu va mai fi egală cu transpirația. De asemenea, se poate întîmpla ca plantele cu care se experimentează să aibă un deficit de apă în acest caz absorbția depășind transpirația. Aceste erori pot fi evitate în bună parte prin secționarea sub curent de apă a ramurei folosite în experiență și prin determinarea apei pierdute prin transpirație, prin cîntărirea potometrului la început și la sfîrșitul experienței.

Pentru a determina intensitatea transpirației trebuie să determinăm mai întîi suprafața foliară a plantei sau ramurei folosite cu ajutorul metodei mulajelor. Pentru aceasta se desprind frunzele, li se desenează conturul pe o hîrtie de calc, se decupează mulajele astfel obținute și se cîntăresc cu o precizie de 0,1 g. Din aceeași hîrtie de calc se decupează un pătrat cu latura de 10 cm (= 1 dm^2) căruia i se determină greutatea. Apoi printr-o regulă de trei simplă se determină suprafața mulajelor frunzelor.

Cunoscînd cantitatea de apă eliminată în timp de o oră și suprafața foliară a plantei sau ramurei cu frunze se calculează intensitatea transpirației exprimată în g apă/dm^2/h.

Intensitatea transpirației se poate raporta și la unitatea de greutate proaspătă (100 g substanță proaspătă). În acest caz se aplică formula:

$$I.tr. = \frac{C \times 100}{g} \text{ în care:}$$

C = cantitatea de apă (în g) eliminată de frunze în timp de o oră
100 = coeficient pentru exprimarea intensității transpirației în %
g = greutatea frunzelor (în g).

13.2.5. DETERMINAREA INTENSITĂȚII TRANSPIRAȚIEI PRIN METODA COLORIMETRICĂ STAHL

Determinarea intensității transpirației prin această metodă are la bază proprietatea sărurilor de cobalt uscate care în prezența vaporilor de apă trec de la culoarea albastră la culoarea roz. Mai des se folosește clorura de cobalt ($CoCl_2$).

Modul de lucru. Se prepară o soluție de clorură de cobalt 5% în care se înmoaie bucăți de hîrtie de filtru avînd grijă ca ele să se îmbibe cît mai uniform. Se lasă apoi să se scurgă excesul de soluție de pe ele și se

usucă la termostat. Hîrtiile uscate, care au o culoare albastră se taie în bucățele mici (0,5/0,5 cm) și se păstrează în eprubete închise în care s-a pus puțină clorură de calciu pentru a crea o atmosferă perfect uscată.

Pentru determinarea intensității transpirației se ia cu penseta o bucată de hîrtie pregătită și se așează pe una din fețele frunzei de cercetat. Hîrtia se fixează pe suprafața frunzei cu ajutorul a două lame de sticlă prinse la capete cu cîte un inel de cauciuc. Intensitatea transpirației se apreciază prin măsurarea timpului necesar virării culorii hîrtiei de la albastru la roz.

13.2.6. DETERMINAREA INTENSITĂȚII TRANSPIRAȚIEI PRIN METODA GRAVIMETRICĂ

Principiul acestei metode constă în cîntărirea plantei, a ramurei sau a frunzei, la care se efectuează determinarea, la începutul experienței și după o oră de repaus la temperatura camerei.

Modul de lucru. Într-un pahar cu apă se introduce pețiolul unei frunze de mușcată căreia i-am determinat suprafața prin metoda mulajelor, iar peste apa din pahar se pune un strat de ulei pentru a opri evaporarea apei (fig. 139). Se cîntărește paharul astfel pregătit, iar după o oră de repaus se cîntărește din nou. La o a doua cîntărire se constată o scădere a greutății care reprezintă apa pierdută de frunză prin transpi-

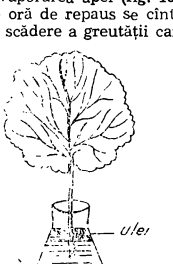


Fig. 139 — Determinarea intensității transpirației prin metoda gravimetrică.

rație. Cunoscînd suprafața frunzei, diferența de greutate (apa pierdută prin transpirație și timpul (în ore) cît a durat experiența se poate calcula intensitatea transpirației care se exprimă în g apă/dm²/h.

13.2.7. EVIDENȚIEREA GUTAȚIEI

Gutația este fenomenul prin care plantele elimină apa sub formă de picături. Acestea sînt eliminate prin niște formațiuni speciale numite hidatode (căi de apă).

Modul de lucru. Se ia un ghiveci cu plante tinere de grîu sau porumb, se udă bine pămîntul din ghiveci, după care se așează ghiveciul pe o placă de sticlă și se acoperă cu un clopot de sticlă. Clopotul se etanșează

pe placa de sticlă cu plastilină sau ceară. Instalația astfel pregătită se ține la întuneric, la temperatura caremei. După cîteva ore la vîrful frunzelor se va putea observa apariția unor picături de apă.

13.2.8. EVIDENȚIEREA CONDUCERII APEI PRIN VASELE DE LEMN

La plantele vasculare apa este condusă de la rădăcină și pînă la frunze prin vasele de lemn grupate în fascicole conducătoare lemnoase (la rădăcină) sau libero-lemnoaste (la tulpină și frunze).

Modul de lucru. Se iau cinci fragmente de ramură de soc lungi de 10—15 cm prevăzute la partea superioară cu cîte doi muguri. La primul fragment se îndepărtează scoarța pe o distanță de 3—4 cm începînd de la bază (fig. 140) la cel de al doilea se îndepărtează măduva pe aceiași distanță; la al treilea se îndepărtează scoarța și măduva; la al patrulea se

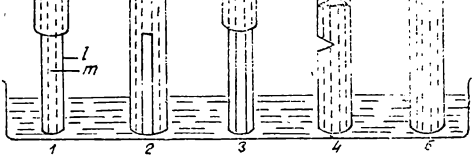


Fig. 140 — Evidențierea conducerii apei în tulpină prin vasele de lemn: 1 — scoarța și liberul îndepărtate la bază; sc — scoarță; l — lemn; m — măduvă; 2 — măduvă îndepărtată; 3 — scoarța, liberul și măduva îndepărtate; 4 — toate țesuturile întrerupte în lung în formă de spirală; 5 — ramură intactă

întrerup toate țesuturile (inclusiv lemnul) făcîndu-se niște crestături cu o lățime de 3—4 mm, de jur împrejurul ramurii, la diferite nivele începînd de la o distanță de 3—4 cm de la capătul inferior al fragmentului; cel de al cincilea fragment se lasă intact. Fragmentele astfel pregătite se introduc cu partea bazală într-un pahar cu apă și se lasă la temperatura camerei. După 3—4 zile se constată că fragmentele 1, 2, 3 și 5 vor forma frunze în timp ce al patrulea fragment (cu vasele de lemn secționate) se va usca. Aceasta ne demonstrează faptul că apa este condusă prin vasele de lemn.

13.2.9. PUNEREA ÎN EVIDENȚĂ A PRESIUNII RADICULARE

Primăvara devreme, înaintea apariției primelor frunze, ascensiunea apei în corpul plantelor este determinată de presiunea radiculară, datorită căreia apa ajunge pînă la muguri. După apariția frunzelor rolul

principal în ascensiunea apei îl joacă forța de sucțiune a celulelor din frunze sau așa numitul apel foliar datorat transpirației.

Modul de lucru. Se ia un ghiveci cu plante de floarea-soarelui sau muștată, se udă bine pământul din ghiveci după care se secționează transversal tulpina la o înălțime de 2—3 cm la suprafața pământului din ghiveci. Pe extremitatea secționată se fixează un tub de cauciuc lung de 5—6 cm cu un diametru interior corespunzător cu diametrul tulpinii secționate iar la capătul opus al acestuia se fixează un tub de sticlă lung de 20—30 cm (fig. 141). Se va avea grijă ca tubul de cauciuc să fie fixat

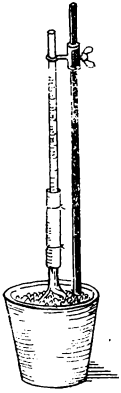


Fig. 141 — Punerea în evidență a presiunii radiculare.

etanș atît la nivelul tulpinii cît și al tubului de sticlă. La nevoie se leagă strîns tubul de cauciuc la cele două extremități cu cîte o bucată de sfoară. Se introduce apoi în tubul de sticlă apă colorată cu puțin albastru de metilen pînă la umplerea tubului de cauciuc și apariția apei colorate la partea bazală a tubului de sticlă. Se notează cu un creion dermatograf nivelul apei în tubul de sticlă și se fixează tubul în poziție verticală cu ajutorul unui băț înfipt în ghiveci.

După cîteva ore se va putea observa că nivelul lichidului din tubul de sticlă s-a ridicat datorită sevei brute împinse de către rădăcinile plantei.

13.2.10. EVIDENȚIEREA ROLULUI TRANSPIRAȚIEI ÎN CONDUCEREA APEI ÎN CORPUL PLANTEI

Frunzele plantelor pierzînd apă prin transpirație determină apariția la nivelul lor a unei presiuni negative sau forță de sucțiune (apel foliar) care va determina absorbția unei noi cantități de apă la nivelul

rădăcinilor și urcarea ei pînă la frunze pentru a înlocui apa pierdută prin transpirație.

Modul de lucru. Se ia un tub de sticlă cu pereții groși căruia i se potrivește la extremitatea superioară un dop de cauciuc care să închidă etanș tubul. Se găurește dopul în centru prin acest orificiu introducînd etanș o ramură de conifer cu porțiunea ce trece prin dop curățită de coajă. După fixarea ramurii în dopul de cauciuc se astupă tubul la capătul inferior cu degetul și se umple cu apă fiartă și răcită. Se fixează apoi dopul cu ramura la partea superioară a tubului și ținînd în continuare astupată partea lui inferioară, aceasta se introduce într-un vas cu mercur (fig. 142). Pentru reușita experienței este necesar ca în interiorul tubului

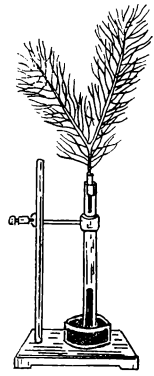


Fig. 142 — Evidențierea rolului transpirației în conducerea apei în corpul pl.

de sticlă să nu rămînă bule de aer la montarea experienței. Instalația astfel montată se lasă în repaus cîteva ore. În acest timp ramura pierde apă prin transpirație, iar în tubul de sticlă se creează o presiune negativă care determină urcarea mercului în interiorul lui.

13.3. NUTRIȚIA MINERALĂ A PLANTELOR

13.3.1. IDENTIFICAREA RAPIDĂ A PRINCIPALELOR ÎNGRĂȘĂMINTE MINERALE

După aspect îngrășămnitele minerale pot fi cristalizate și amorfe. Sub formă cristalizată se întîlnesc toate îngrășămintele azotate (afară de cianamida de Ca) și toate îngrășămintele potasice, iar sub formă amorfă îngrășămintele cu fosfor și calciu.

Ele se mai pot grupa în : îngrășăminte solubile în apă (cele azotate și potasice) și îngrășăminte insolubile în apă (cele cu fosfor și calciu).

Identificarea lor se face după flacăra pe care o dau la ardere și după felul cum ard precum și după unele reacții chimice specifice.

Modul de lucru. Se încep determinările cu sărurile cristalizate solubile în apă. La început se urmărește comportarea lor pe cărbune de lemn încins. Dacă îngrășământul face explozie și arde imediat este un îngrămînt cu azot.

Îngrășămintele cu azot se deosebesc între ele în primul rînd după culoarea flăcării. Astfel NH_4NO_3 arde cu flacără incoloră, uneori doar se topește și produce un fum alb cu miros de amoniac. $NaNO_3$ face explozie și arde cu o flacără galbenă. KNO_3 face explozie și arde cu o flacără violetă.

În al doilea rînd ele se deosebesc după reacția pe care o dau cu un hidroxid. Prin tratarea unei soluții de NH_4NO_3 cu o soluție de hidroxid de Na sau K 10% se degajă amoniac (se recunoaște după miros) după reacția :

$$NH_4NO_3 + NaOH = NaNO_3 + NH_4OH$$
$$NH_4OH \rightarrow NH_3 + H_2O$$

KNO_3 și $NaNO_3$ nu dau această reacție. $(NH_4)2SO_4$ pe cărbune încins scoate un fum alb cu miros de amoniac ca și NH_4NO_3 dar se deosebește de acesta prin reacția cu soluția de BaCl 5% cu care formează un precipitat alb de sulfat de bariu după reacția : $(NH_4)\ 2SO_4 + BaCl_2 = BaSO_4 + 2NH_4Cl$.

Pentru a ne convinge că precipitatul alb este sulfat de bariu se adaugă în eprubetă acid clorhidric 1%. Dacă precipitatul nu se dizolvă îngrășămîntul este sulfat de amoniu (NH_4NO_3 nu dă precipitat cu $BaCl_2$, dar poate da o tulbureală care se dizolvă la adăugarea acidului clorhidric 1%.

Ureea — $CO(NH_2)^2$ — este un îngrășămînt azotat care pe cărbune degajă amoniac dar care tratat cu un hidroxid nu degajă amoniac.

Îngrășămintele cu potasiu spre deosebire de îngrășămintele cu azot nu dau reacții caracteristice pe cărbune încins. Ele se deosebesc între ele după aspectul exterior și după unele reacții chimice.

KNO_3 este alcătuit din cristale mici albe sau roz-roșiatice.

KCl se prezintă sub formă de cristale mici albe.

K_2SO_4 se prezintă sub formă de cristale albe sau galbene. Spre deosebire de KNO_3 și KCl el dă cu soluția de $BaCl_2$ un precipitat alb de sulfat de bariu după reacția : $K_2SO_4 + BaCl_2 = 2KCl + BaSO_4$. Acest precipitat este insolubil în acid clorhidric 1%. KNO_3 și KCl cu soluția de $BaCl_2$ dau doar o slabă tulbureală.

Spre deosebire de sulfatul de amoniu, sulfatul de potasiu tratat cu un hidroxid nu degajă amoniac.

Îngrășămintele amorfe. Se observă comportarea lor față de acidul clorhidric 1%. În cazul producerii de efervescență avem de face sau cu $CaCO_3$ sau cu zgura lui Thomas. Acestea se deosebesc între ele prin culoare : zgura lui Thomas fiind cenușie închisă și prin aceea că la adăugarea de acid clorhidric 1% ea degajă hidrogen sulfurat.

Superfosfatul și făina de oase se deosebesc prin :

— superfosfatul are culoare albă sau cenușie, are reacție acidă datorită prezenței de acizi liberi (acid fosforic și sulfuric).

— făina de oase este de culoare cenușiu-deschisă și arde pe cărbune încins dînd un miros de corn ars.

Cianamida de calciu ($CaCN_2$) este un preparat negru-albăstrui care tratat cu acid produce efervescență și care are o reacție alcalină.

13.3.2. CULTURI DE PLANTE PE MEDII SOLIDE UMECTATE CU SOLUȚII MINERALE NUTRITIVE

Cultura plantelor pe medii solide este de fapt o variantă a hidroculturii în care se folosește un înlocuitor de sol, inert din punct de vedere chimic, care joacă doar rolul de suport al plantelor și care este umectat cu soluție minerală nutritivă.

Drept mediu solid se întrebuințează nisip de cuarț calcinat și spălat cu un acid și apoi cu apă distilată, cărbune animal, bile de sticlă iar în ultimul timp granule de material plastic cum ar fi de exemplu polistirenul.

Pentru demonstrarea rolului diferitelor elemente minerale în viața plantelor se folosesc o serie de soluții minerale nutritive Knop, din care se scoate pe rînd cîte un element.

Modul de lucru. Se pregătesc mai întîi vasele de experiență. Acestea se parafinează la interior pentru a evita trecerea unor ioni din pereții vaselor în soluția minerală nutritivă și se acoperă la exterior cu hîrtie neagră pentru a împiedica dezvoltarea algelor în mediul de cultură. Drept vase de experiență se pot folosi pahare Berzelius de diferite dimensiuni în funcție de talia plantei cu care se experimentează.

Se pregătește gama de soluții minerale nutritive cu care se umectează mediul solid (polistirenul granulat) pe care se cultivă plantele. Drept soluție minerală nutritivă se va folosi soluția Knop în următoarele variante : V_1 — soluția completă ; V_2 — soluția Knop fără N ; V_3 — soluția Knop fără P ; V_4 — soluția Knop fără K după compoziția indicată în tabelul de mai jos.

Soluții

Completă (V_1)	g/l	fără N (V_2)	fără P (V_3)	fără K (V_4)
$Ca(NO_3)_2$	1,0	$CaSO_4$	$Ca(NO_3)_2$	$Ca(NO_3)_2$
KH_2PO_4	0,25	KCl	KCl	NaCl
$MgSO_4$	0,25	$MgSO_4$	$MgSO_4$	$MgSO_4$
KCl	0,25	KH_2PO_4	KCl	NaH_2PO_4
Fe_2Cl_6 10%	cîteva picături	Fe_2Cl_6	Fe_2Cl_6	Fe_2Cl_6

În varianta fără azot se înlocuiește azotatul de Ca, în soluția fără fosfor se înlocuiește fosfatul acid de K iar în soluția fără potasiu se înlocuiesc atît clorura de potasiu cît și fosfatul de potasiu cu săruri care nu conțin azot ($CaSO_4$), fosfor (KCl) și respectiv potasiu (NaCl și NaH_2PO_4).

Dăm în continuare un exemplu de calculare a cantității de substanță cu care se înlocuiește un anumit element din soluția minerală nutritivă.

De exemplu la soluția fără azot în loc de $Ca(NO_3)^2$ se adaugă $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ în așa fel ca în mediu de cultură să avem aceeași cantitate de calciu. Pentru aceasta facem următorul raționament :

dacă în 164 g $Ca(NO_3)^2$ se găsesc 40,04 g Ca

$$\frac{\text{în 1 g } Ca(NO_3)^2 \text{ se vor găsi X g Ca}}{X = \frac{40,04 \times 1}{164} = 0,24 \text{ g}}$$

Pentru a afla în cîte grame de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ se găsesc 0,24 g Ca facem raționamentul :

40,04 g Ca se găsesc în 172,16 g $CaSO_4 \cdot 2H_2O$

$$\frac{\text{0,24 g Ca se vor găsi în X g } CaSO_4 \cdot 2H_2O}{X = \frac{172,16 \times 0,24}{40,04} = 1,03 \text{ g}}$$

deci în soluția fără azot în loc de 1 g $Ca(NO_3)^2$ se va pune 1,03 g $CaSO_4 \cdot 2H_2O$.

Calcule similare se fac și pentru celelalte înlocuiri.

După ce au fost pregătite vasele de experiență și s-au preparat soluțiile minerale nutritive în variantele menționate anterior se trece la montarea experiențelor.

Se umplu paharele Berzelius cu polistiren granulat, se introduc cîte două plăntuțe în fiecare dintre ele avînd grijă să se aleagă plăntuțe de aceleași dimensiuni pentru toate variantele experienței și se lipește pe fiecare pahar cîte o etichetă cu varianta respectivă și data montării experienței. Fiecare variantă se montează în cel puțin 3 repetiții. Se umectează plăntuțele cu soluțiile minerale corespunzătoare și se trec sub o baterie de buturi fluorescente.

Soluțiile nutritive se aerisesc zilnic timp de 3—5 minute cu ajutorul unui suflător electric sau cu o pară de cauciuc. Apa pierdută prin evapotranspirație se completează periodic cu apă distilată.

La fiecare 5—7 zile se schimbă soluția minerală nutritivă deoarece aceasta își schimbă concentrația și componența inițială datorită pe de o parte absorbției iar pe de altă parte datorită procesului de desorbție.

După aproximativ 2—3 săptămîni se observă aspectul plantelor din variantele experienței și se determină înălțimea plantelor, numărul de frunze, suprafața foliară și greutatea proaspătă și uscată pe organe. Datele obținute vor fi trecute într-un tabel de forma :

Varianta	I pl.	Nr. fr.	S. fr.	Greut. proaspătă				Greut. uscată				Obs.
				R.	T.	Fr.	Total	R.	T.	Fr.	Total	
V_1												
V_2												
V_3												
V_n												

Cu datele obținute se construiesc niște grafice și se face interpretarea rezultatelor.

13.4. FOTOSINTEZA

13.4.1. PUNEREA ÎN EVIDENȚĂ A FOTOSINTEZEI PRIN METODA BULELOR

Prin această metodă se evidențiază eliberarea de oxigen în procesul de fotosinteză de către macrofitele acvative submerse.

Modul de lucru. Se ia o ramură a unei plante submerse (Elodea canadensis de exemplu), se secționează oblic la partea bazală cu ajutorul unei lame de ras și se introduce cu vîrful în jos într-o eprubetă cu apă de robinet. Se fixează ramura cu ajutorul unei baghete de sticlă astfel ca partea secționată să fie cu 2—3 cm sub nivelul apei și să nu atingă pereții eprubetei (fig. 143). Se expune eprubeta, introdusă într-un stativ,

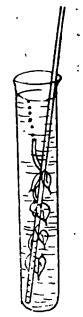


Fig. 143 — Metoda bulelor.

la lumina unui bec sau la lumina solară și după 2—3 minute se observă că prin partea secționată încep să se degaje bule de gaz. Ele sînt formate din oxigenul eliminat de plantă în procesul de fotosinteză, amestecat cu azot și CO_2 din apă. Dacă ramura nu degajă bule se face o nouă secțiune mai oblică iar dacă bulele degajate sînt în număr prea mare se face o nouă secțiune mai puțin oblică.

31.4.2. PUNEREA ÎN EVIDENȚĂ A AMIDONULUI PRODUS ÎN FOTOSINTEZĂ

Sinteza amidonului în procesul de fotosinteză se evidențiază cu ajutorul probei cu iod a lui Sachs.

Modul de lucru. Una sau mai multe frunze de mușcată sînt acoperite cu hîrtie neagră o figură oarecare după care se ține ghiveciul cu planta la întuneric, pentru ca frunzele ei să se golească de amidon, în urma procesului de transport al asimilatelor în celelalte organe ale plantei. Apoi este expus ghiveciul la lumină timp de cîteva ore după care se detașează frunza acoperită parțial cu hîrtie neagră, se fierbe în apă timp de 2 minute (pentru a omorî celulele frunzei și a facilita extracția pigmenților asimilatori) după care se fierbe în alcool etilic pînă la decolorare (se extrag astfel pigmenții asimilatori). Fierberea frunzei în alcool

trebuie să se facă la flacără mică după ce în prealabil s-a acoperit paharul cu o sticlă de ceas pentru a evita eventuala aprindere a vaporilor de alcool. Se scoate apoi frunza din pahar, se spală cu apă și se introduce într-o sticlă de ceas sau cutie Petri care conține soluție de iod în iodură de K (soluție Lugol). După 2—3 minute de contact cu această soluție se scoate frunza și se etalează pe o placă de faianță albă. Se va observa că limbul frunzei s-a colorat în albastru doar în zonele care nu au fost acoperite cu hîrtie neagră, zone în care în timpul fotosintezei s-au sintetizat substanțe organice printre care și amidonul care se colorează în albastru în prezența soluției Lugol.

13.4.3. EVIDENȚIEREA NECESITĂȚII PREZENȚEI PIGMENȚILOR ASIMILATORI PENTRU DESFĂȘURAREA PROCESULUI DE FOTOSINTEZĂ

Pentru evidențierea necesității prezenței pigmenților asimilatori în procesul de fotosinteză, se folosesc plante de Coleus (Urzicuță). Frunzele acestor plante se caracterizează prin faptul că în partea centrală a limbului conțin pigmenți antocianici și nu pigmenți asimilatori.

Modul de lucru. Se detașează o frunză pe de o plantă care a fost ținută în prealabil cîteva ore la lumină, se introduce într-un pahar Berzelius cu apă și se fierbe pentru a omorî celulele și a extrage pigmenții antocianici. Apoi se procedează la extragerea pigmenților asimilatori prin fierberea frunzei în alcool. După extragerea pigmenților asimilatori se spală frunza cu apă și se trece într-un cristalizor cu soluție Lugol care colorează amidonul în albastru. După 2—3 minute se scoate frunza din cristalizor, se spală cu apă și se etalează pe o placă de faianță albă. Se va observa că limbul s-a colorat în albastru numai în zonele care au posedat pigmenți asimilatori (zonele marginale) nu și în zona centrală lipsită de pigmenți asimilatori și bogată în pigmenți antocianici. Aceasta ne demonstrează faptul că amidonul se sintetizează la lumină doar în prezența pigmenților asimilatori.

13.4.4. EVIDENȚIEREA NECESITĂȚII PREZENȚEI CO_2 PENTRU DESFĂȘURAREA FOTOSINTEZEI

Dioxidul de carbon reprezintă sursa de carbon pentru sintezele organice care au loc în procesul de fotosinteză așa încît în lipsa lui plantele nu mai sintetizează substanțe organice, fotosinteza blocîndu-se.

Modul de lucru. Într-o eprubetă cu apă de conductă se introduce o ramură de Elodea canadensis după ce a fost secționată oblic la partea bazală cu ajutorul unei lame de ras. Se fixează eprubeta într-un stativ care se plasează la o distanță de 20—30 de cm de un bec electric și se numără bulele degajate de plantă în timp de 1 minut. Cînd numărul de bule degajate în timp de 1 minut a devenit constant, se înlocuiește apa din eprubetă cu apă de conductă fiartă timp de 20 de minute și lăsată să se răcească la temperatura camerei. Plasînd stativul cu eprubeta la aceeași distanță față de sursa de lumină se va constata că degajarea de bule nu mai are loc deoarece prin fierbere s-a înlăturat dioxidul de carbon solvit în apă. În cazul cînd ramura va degaja totuși un număr mic de bule acest lucru se datorește faptului că în timpul răcirii apei a

avut loc dizolvarea în ea a unei cantități mici de dioxid de carbon din aer.

Dacă în apa din eprubetă se adaugă o mică cantitate de bicarbonat de sodiu, cu ajutorul unei baghete de sticlă al cărei capăt a fost udat în prealabil cu apa din eprubetă pentru ca să adere substanța de suprafața ei, după dizolvarea și difuzarea substanței se va constata că ramura începe să degaje un număr mare de bule deoarece bicarbonatul de sodiu pune în libertate dioxid de carbon conform reacției :

$$2NaHCO_3 \rightarrow CO_2 + Na_2CO_3 + H_2O$$

13.4.5. SEPARAREA PIGMENȚILOR ASIMILATORI PRIN METODA CROMATOGRAFIEI PE HÎRTIE

Plantele fotoautotrofe, adaptate la îndeplinirea procesului de fotosinteză conțin un ansamblu de pigmenți ce intervin în acest proces, ansamblu cunoscut sub denumirea de pigmenți asimilatori. Aceștia se împart în trei grupe și anume : pigmenți clorofilieni, pigmenți carotenoizi și pigmenți ficobilinici. Cu excepția pigmenților ficobilinici (ce pot fi extrași în apă distilată) toți ceilalți pigmenți asimilatori pot fi extrași cu ajutorul unor solvenți organici (alcool etilic, alcool metilic, acetonă etc.) prin mojarare la rece sau prin fierbere.

Separarea pigmenților asimilatori din extractul de clorofilă brută prin metoda cromatografică se bazează pe capacitatea acestora de a fi absorbiți în mod diferit de către anumite substraturi.

Modul de lucru. Se extrag pigmenții asimilatori din frunze prin una din metodele amintite mai sus obținîndu-se un extract de clorofilă brută.

Pentru separarea pigmenților asimilatori din soluție se procedează în felul următor : pe o fîșie de hîrtie de filtru, lată de 3 cm și lungă de 15—20 cm, se trasează cu ajutorul unei piepete Pasteur la unul din capete — la o distanță de 2 cm — o dungă transversală de soluție de pigmenți. După ce se usucă se repetă operația de 10—15 ori, pentru a obține o bandă intens colorată. După fiecare trasare este necesară uscarea hîrtiei de filtru. Se introduce apoi hîrtia de filtru într-un cilindru de sticlă fixîndu-se de cîrligul baghetei ce străbate dopul cu partea opusă dungii colorate, astfel ca hîrtia să nu atingă pereții cilindrului și nici amestecul format din 30 părți benzină, o parte acetonă și 0,3 părți alcool metilic care se găsește pe fundul cilindrului. Se ține hîrtia suspendată deasupra amestecului 15—20 de minute pentru ca în interiorul cilindrului să se formeze o atmosferă saturată în vaporii celor trei substanțe din amestec după care prin apăsarea baghetei se introduce capătul inferior al hîrtiei de filtru în amestec pe o distanță de 0,5 cm (fig. 144). Solventul se va ridica prin capilaritate de-a lungul hîrtiei antrenînd cu el pigmenții, care datorită gradului diferit de absorbție se vor repartiza astfel : La partea superioară carotina, marcată printr-o dungă portocalie, apoi xantifila de culoare galbenă, clorofila a de culoare verde-albăstruie și clorofila b de culoare verde-gălbuie.

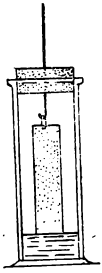


Fig. 144 — Instalație pentru separarea pigmenților clorofilieni.

13.4.6. DETERMINAREA INTENSITĂȚII FOTOSINTEZEI PRIN METODA MANOMETRICĂ WARBURG

Principiu metodei constă în determinarea volumului de oxigen degajat în fotosinteză, într-un sistem închis, prin măsurarea variației de presiune în condiții de volum și temperatură constantă.

Instalația Warburg. Aceasta se compune din două părți :

— *Partea mecanică,* alcătuită dintr-o baie termostat ce menține temperatura la o valoare constantă și reglabilă și dintr-un dispozitiv de agitare mecanică (pentru agitarea apei din baia termostat, a materialului vegetal și a reactivilor care se introduc în cea de a doua parte componentă a instalației).

— *Garniturile — Vas de reacție — manometru.*

Vasele de reacție prezintă un diverticol lateral, astupat cu un dop cu șlif iar în interior un păhărel central. Diverticolul lateral și păhărelul central servesc la introducerea reactivilor necesari în determinări, iar materialul vegetal se introduce în jurul păhărelului central. Manometrele sînt confecționate din tuburi de sticlă în forma literei U, prezentînd două brațe dintre care unul este deschis iar celălalt este prevăzut cu un robinet cu trei căi. Brațul cu robinet prezintă o ramificație laterală prevăzută cu un con de racordare la care se fixează vasele de reacție. Ambele brațe ale manometrelor sînt gradate în cîte 300 de diviziuni. La partea inferioară manometrele prezintă un rezervor pentru lichidul manometric așezat sub plăcuța unei cleme cu șurub a plăcii suport a manometrului. Această clemă permite reglarea nivelului lichidului manometric în ramurile manometrului. Ca lichid manometric se folosește lichidul Brodie.

Pregătirea instalației pentru determinări. Întrucît metoda permite determinarea cantităților de gaze produse sau consumate dintr-un sistem închis prin măsurarea variației de presiune în condiții de volum constant și temperatură constantă, este absolut necesar ca, înainte de a trece la efectuarea determinărilor să se stabilească volumul total al

sistemului închis (V), reprezentat prin volumul vasului de reacție, volumul ramificației laterale a brațului cu robinet al manometrului și volumul cuprins între robinetul manometrului și diviziunea 150 de pe brațul cu robinet al acestuia.

Pentru determinarea volumului garniturii vas de reacție-manometru se procedează în felul următor :

— Se curăță bine vasele de reacție și manometrele cu amestec sulfo-cromic (soluție de bicromat de potasiu 30% și acid sulfuric cu densitatea 1,84, în proporție de 1 : 3) se spală cu apă distilată și se usucă.

— Se atașează la extremitatea inferioară a manometrelor tuburile de cauciuc care servesc ca rezervor de lichid manometric, se fixează manometrele pe plăcile suport și se așează în poziție verticală pe un stativ confecționat special pentru ținerea lor.

— Prin injectare cu ajutorul unei seringi se introduce în rezervoarele de lichid manometric, soluție Brodie, într-o cantitate necesară, astfel încît prin manevrarea șurubului fixat deasupra rezervorului, lichidul manometric să poată fi deplasat de la diviziunea 0 pînă la diviziunea 300 pe ambele brațe ale manometrului. În cazul în care lichidul Brodie din manometre prezintă întreruperi se procedează la eliminarea bulelor de aer din brațele manometrului prin apăsări repetate cu degetul pe rezervorul cu soluție.

— Robinetele manometrelor se ung în strat fin cu unsoare de robinet și se răsucesc în lăcașurile lor pînă cînd privite prin transparență șlifurile nu mai prezintă striuri.

— Se răsucesc robinetele manometrelor astfel încît să fie în poziție deschis (să asigure comunicarea dintre tubul manometric și atmosfera exterioară) și se atașează de conul de racordare al manometrelor cîte un vas de reacție, după ce în prealabil s-a uns șliful conurilor cu unsoare de robinet. Se asigură fixarea vaselor atașînd pe ghearele de sticlă cu care sînt prevăzute vasele de reacție și conurile de racordare, arcurile metalice prevăzute în dotarea instalației, sau în lipsa acestora de cauciuc.

— Se fixează garniturile vas de reacție-manometru la cadrul metalic de agitare mecanică a instalației, astfel ca vasele de reacție să fie scufundate complet în apă din baia termostat, aflată la temperatura camerei.

— Se aduce pe brațul cu robinet al fiecărui manometru nivelul lichidului Brodie la diviziunea 130.

— Se închid robinetele manometrelor și manevrînd șurubul de la rezervorul cu lichid manometric, se aduce nivelul soluției la diviziunea 150 pe brațul cu robinet. Din cauza modificării presiunii în sistemul închis, nivelul soluției în brațul deschis al manometrului va urca (fig. 145). Se citește pentru fiecare garnitură vas de reacție-manometru această diferență de presiune pe brațul deschis al manometrelor, scăzînd din numărul de diviziuni la care s-a ridicat nivelul lichidului Brodie, 150 de diviziuni. Această deviere (H_1) se notează într-un tabel întocmit după modelul alăturat.

Nr. garnituri	H_1 (diviziuni)	H_2 (diviziuni)	Volumul sistemului închis V (mm^3)

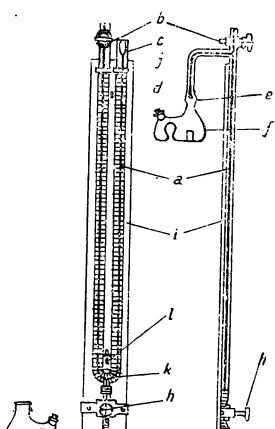


Fig. 145 — Garnitură vas de reacție — manometru : A — vasul de reacție ; B — garnitura vas de reacție — manometru văzută din față ; C — garnitura vas de reacție — manometru, din profil ; a — capilarul manometrului ; b — robinet ; c — porțiunea dilatată a capilarului de pe ramura deschisă a manometrului ; d — ramificația laterală a manometrului ; e — conul de racordare ; f — vas de reacție ; g — rezervorul cu lichid manometric ; h — șurubul de manevrare a lichidului manometric ; i — placa metalică pe care se fixează manometrul ; j — clema de fixare a manometrului pe placa metalică ; k — suport de sprijin al manometrului pe placa metalică ; l — orificiile de fixare a plăcii metalice la cadrul dispozitivului de agitare mecanică a instalației.

— Se deschid robinetele manometrelor, se detașează garniturile vas de reacție manometru de pe cadrul metalic de agitare, se scot vasele de reacție de pe conurile de racordare și se introduc cu ajutorul unei pipete în fiecare vas de reacție cite 10 ml apă distilată aflată la temperatura camerei, măsurată foarte exact.

— Se atașează din nou vasele de reacție la manometrele corespunzătoare, respectînd indicațiile anterioare, se fixează garniturile vas de reacție-manometru la cadrul metalic de agitare și se aduce pe brațul cu robinet al fiecărui manometru, nivelul lichidului Brodie la diviziunea 130.

— Se închid robinetele manometrelor, se aduce nivelul lichidului la diviziunea 150 pe brațul cu robinet al acestora și se citește variația de presiune H_2 pe brațul lor deschis. Se notează rezultatele obținute în tabelul întocmit după modelul dat.

— Se calculează volumul total (V) al fiecărei garnituri vas de reacție-manometru, cu ajutorul formulei : $V = a.\frac{H_2}{H_2 - H_1}$ în care a, re-

prezintă volumul de apă distilată introdusă în vasele de reacție (în mm^3). Rezultatele se înscriu în tabelul dat.

După efectuarea volumului total al fiecărei garnituri vas de reacție-manometru, se deschid robinetele, se scot garniturile vas de reacție-manometru din baia termostat, se fixează în stativ și se detașează vasele de reacție de pe conurile de racordare. Se numerotează vasele de reacție cu același număr care este imprimat pe placa suport a manometrelor, se înlătură apa distilată, se curăță de grăsime șlifuI vaselor de reacție și apoi se usucă. La determinări garniturile vas de reacție-manometru se folosesc numai în combinația în care s-a stabilit volumul lor total.

Modul de lucru. Pentru determinarea intensității fotosintezei se procedează în felul următor :

— Se introduc în vasele de reacție suspensia de alge verzi unicelulare și reactivii necesari. În fiecare vas de reacție, în spațiul din jurul păhărelului central se introduce un volum bine determinat de suspensie de alge (5 ml de exemplu), apoi se introduce în păhărelul central un volum de 0,5 ml soluție tampon Warburg nr. 6.

Într-un vas de reacție se introduce apă distilată într-un volum egal cu volumul suspensiei de alge plus soluția tampon. Acest vas de reacție atașat la manometrul corespunzător va juca rol de termobarometre, înregistrînd variațiile de temperatură și presiune în timpul determinării.

— Se atașează vasele de reacție la manometrele corespunzătoare avînd grijă ca robinetele acestora să fie deschise, se consolidează fixarea vaselor de reacție la conurile de racordare și se fixează garniturile vas de reacție-manometru la cadrul metalic de agitare mecanică al instalației, astfel ca vesele de reacție să fie scufundate complet în apa din baia termostat.

— Se aduce nivelul lichidului Brodie din brațele cu robinet ale manometrelor, la diviziunea 150, se fixează pe termometrul releului de termostatare temperatura de lucru (de exemplu 30°C), se cuplează sistemul de încălzire al băii termostat și se pornește agitația mecanică, reglînd din butoul corenspunzător, viteza acestuia la o valoare medie. Se lasă 20—30 de minute pentru echilibrare termică (a vaselor de reacție cu apa din baia termostat) și se controlează temperatura băii termostat cu ajutorul termometrului de control iar la nevoie se corectează temperatura cu ajutorul dispozitivului de reglaj.

— După echilibrarea termică se oprește agitarea mecanică, se controlează dacă nivelul lichidului Brodie a rămas la diviziunea 150 pe brațul cu robinet al manometrelor (la nevoie se corectează) și se închid robinetele manometrelor, după care se pornește agitarea mecanică și se notează ora începerii determinării.

— În timpul determinării se poate ivi următoarea situație : ca urmare a faptului că materialul vegetal absoarbe dioxid de carbon, a cărui concentrație este menținută în sistemul închis la o valoare constantă de către soluția tampon, nivelul lichidului manometric din brațul cu robinet se deplasează în jos, iar în brațul deschis, în sus, ca urmare a oxigenului degajat (fig. 13).

În garnitura vas de reacție-manometru fără suspensie de alge se înregistrează rezultanta variațiilor de temperatură și presiune din timpul determinării. Dacă în timpul determinării are loc o mărire a temperaturii în baia termostat și o scădere a presiunii atmosferice nivelul lichidului manometric se va deplasa în jos în brațul cu robinet și în sus în brațul deschis al manometrului. Dacă se micșorează temperatura în baia termostat și se mărește presiunea atmosferică deplasarea lichidului în brațele manometrului se face invers decît în cazul precedent. În cazul în care atît temperatura în baie cît și presiunea atmosferică rămîn constante, lichidul manometric rămîne în ambele brațe la diviziunea 150 la care a fost fixat inițial.

— După un interval de timp care depinde de intensitatea fotosintezei timp care se notează, se oprește agitația mecanică și se aduce nivelul lichidului Brodie în brațul cu robinet al manometrului la diviziunea 150 pentru a realiza cerința impusă de principiul metodei-determinarea variației de presiune în sistemul închis în condiții de volum constant și se citește variația de presiune pe brațul deschis al monmetrului, notînd rezultatele într-un tabel întocmit după modelul :

Denumirea materialului vegetal.	Nr. garnitură vas de reacție-manom.	Data începerii determinării.	Ora terminării determinării.	Durata determinării (în minute).	Variația de presiune (diviziuni).	Devierea reală (h) (diviziuni)	Constanta garniturii (K)	mm³ O₂ degajați (K. h).	Intensitatea fotosintezei.	Observații.

Rezultatele referitoare la variația de presiune și la devierea reală se notează astfel : variația de presiune va fi egală cu numărul de diviziuni la care se găsește lichidul Brodie în brațul descsis al manometrului din care se scad 150 diviziuni. Variațiile de presiune indicate de termobarometru se calculează în același mod, notîndu-le cu semnul + sau —. Devierea reală (h) rezultă din corectarea variațiilor de presiune citite la garniturile vas de reacție-manometru cu suspensie de alge, cu indicațiile termobarometrului (Tb). Dacă devierea lichidului manometric în Tb s-a făcut în același sens ca în garnitura cu suspensie de alge, din indicația acestuia se scade indicația citită la Tb (în diviziuni). Dacă deplasarea lichidului manometric în ramura deschisă de la Tb s-a făcut în sens contrar celui înregistrat la garnitura cu suspensie de alge, la indicația acestuia se adaugă valoarea citită la Tb. Dacă Tb nu înregistrează nici o deviere, citirile la garniturile cu suspensie de alge reprezintă chiar devierea reală.

— Se deschid manometrele, se oprește încălzirea băii, se deconectează instalația de la rețeaua de curent, se detașează vasele de reacție

iar manometrele se fixează pe stativ. Vasele de reacție se curăță și se usucă.

— Se calculează pentru fiecare garnitură vas de reacție-manometru în care a fost suspensie de alge, constanta garniturii (K) valabilă pentru condițiile în care s-a lucrat. Constanta se calculează după formula :

$$K = \frac{(V - V_1)^{\frac{273}{T}} + V\alpha}{P_o}$$ în care :

V = volumul sistemului închis (volumul vasului de reacție, al ramificației laterale a manometrului și al brațului cu robinet al acestuia pînă la diviziunea 150) în mm^3.

V_1 = volumul materialelor introduse în vasul de reacție în mm^3.

273 = temperatura absolută (°C).

T = 273 + temperatura de lucru.

α = coeficientul de solubilitate al gazului urmărit la temperatura de lucru.

P_0 = 10.000, reprezintă înălțimea coloanei de lichid Brodie, în mm, care corespunde presiunii atmosferice standard.

Coeficienții de solubilitate ai CO_2 și O_2 în apă la diferite temperaturi

Temperatura	O_2	CO_2
0	0,0489	1,713
10	0,0380	1,194
20	0,0310	0,878
30	0,0262	0,665
40	0,0231	0,530

— După stabilirea constantei se calculează intensitatea fotosintezei la suspensiile de alge după formula :

$$If. = \frac{mm^3O_2 \cdot 60 \cdot A}{t.B}$$ în care :

A = numărul de celule din volumul suspensiei folosit la determinare.

B = 1.000.000 deoarece raportarea intensității fotosintezei se face la un milion de celule.

mm^3O_2 — rezultă din înmulțirea constantei K cu devierea reală h.

t = durata determinării (în minute).

13.4.7. DETERMINAREA INTENSITĂȚII FOTOSINTEZEI LA FRUNZELE PLANTELOR AERIENE PRIN METODA MANOMETRICĂ (N. SĂLĂGEANU)

Această metodă reprezintă o modificare a metodei manometrice Warburg, pentru măsurarea intensității fotosintezei frunzelor plantelor aeriene. Modificarea adusă prezintă avantajul că difuziunea gazelor în aer are loc cu o viteză mult mai mare decît în apă și că repartizarea gazelor între faza lichidă și cea gazoasă se realizează cu atît mai repede cu cît suprafața de contact este mai mare.

Pentru determinarea intensității fotosintezei frunzelor se folosește instalația Warburg, la manometrele căreia se atașează vasele de asimilație ce constau din vase cilindrice cu un diverticol și cu capace cu tubulură ce permit atașarea lor la manometru (fig. 146). Vasele se atașează direct la manometrele Warburg.

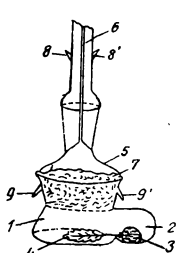


Fig. 146 — Cameră de asimilație pentru determinarea intensității fotosintezei frunzelor aeriene: 1 — cameră de asimilație; 2 — prelungirea ei; 3 — rezervor cu apă; 4 — frunza; 5 — capacul camerei de asimilație; 6 — manometru; 7 — vată îmbibată cu soluție tampon; 8, 8' și 9, 9' — cîrlige pentru fixarea camerei de asimilație la manometru.

Modul de lucru. Se introduce o frunză cu o suprafață de aproximativ 14,5—15 cm^2 sau un mulaj de frunză pe fundul vasului de asimilație, orientată astfel încît suprafața superioară să fie spre sursa de lumină. Pețiolul frunzei sau al mulajului de frunză se introduce într-o cupă mică confecționată dintr-un tub de plastic și în care se pune apă pentru ca frunza sau mulajul de frunză să nu se ofilească în timpul cît durează experiența. În capacul vasului se introduce 0,8 g vată hidrofilă care se îmbibă cu 2 ml de soluție tampon Warburg (amestec proaspăt de soluție 0,1 M de Na_2CO_3 și soluție 0,1 M de $NaHCO_3$ în anumite proporții). Se pregătește la fel, dar fără frunză un termobarometru pentru corecția rezultatelor. La prepararea soluției tampon recomandăm amestecarea a 3 ml soluție de Na_2CO_3 0,1 M cu 17 ml soluție de $NAHCO_3$ 0,1 M.

Îmbibînd vata hidrofilă cu soluție tampon Warburg se realizează o mărire considerabilă a suprafeței de difuziune și avînd în vedere viteza mare de difuziune a gazelor în gaze echilibrul între faza lichidă și cea gazoasă se realizează repede, astfel încît agitarea vaselor în baia cu apă nu mai este necesară.

Pentru iluminarea frunzelor în timpul experienței se folosesc becuri electrice situate sub baia de apă a instalației Warburg, iluminînd frunza de jos în sus.

După ce vasele de asimilație au stat 20—30 de minute pentru echilibrare termică se poate începe determinarea intensității fotosintezei, închizînd robinetele manometrelor după ce în prealabil s-a adus lichidul manometric la diviziunea 150.

În timpul experienței concentrația de CO_2 rămîne constantă iar concentrația de O_2 crește pe baza oxigenului eliberat în procesul de

fotosinteză determinînd o creştere a presiunii în interiorul sistemului închis creştere care va determina coborîrea lichidului manometric în braţul cu robinet al manometrului şi urcarea lui în braţul deschis. După trecerea timpului de experienţă (de regulă 30 de minute) se va stabili denivelarea reală pentru fiecare manometru în parte în acest sens procedîndu-se la fel ca în cazul determinării intensităţii fotosintezei la algele verzi unicelulare.

Cunoscînd devierea reală şi constanta fiecărei garnituri vas de asimilaţie-manometru (calculată după procedeul descris în experienţa anterioară) se calculează cantitatea de oxigen degajată de frunza sau mulajul de frunză folosit (mm^3O_2 = h.K).

Intensitatea fotosintezei se calculează după formula :

$$\text{If.} = \frac{A°60 \cdot 100}{t.S} = cm^3O_2/dm^2/h \text{ în care :}$$

A = cm^3O_2 degajat în timpul experienţei

60 = numărul de minute dintr-o oră

100 = numărul de cm^2 dintr-un decimetru pătrat

t = timpul de experienţă

S = suprafaţa frunzei sau a mulajului frunzei în cm^2.

13.4.8. DETERMINAREA INTENSITĂŢII FOTOSINTEZEI DUPĂ CANTITATEA DE DIOXID DE CARBON CONSUMAT

Metoda se bazează pe determinarea cantităţii de dioxid de carbon absorbit de frunzele plantelor, dintr-un volum de aer cunoscut, în procesul de fotosinteză.

Modul de lucru. Frunza sau ramura căreia i se determină intensitatea fotosintezei se leagă cu o aţă după ce în prealabil capătul peţiolului sau al ramurei a fost înfăşurat cu puţină vată îmbibată cu apă pentru evitarea ofilirii ei în timpul determinărilor. Se introduce apoi furnza sau ramura cu frunze în interiorul unui balon Erlenmeyer în aşa fel încît capătul aţei să rămînă la exterior şi se astupă apoi cu un dop de cauciuc. Se astupă de asemenea cu un dop de cauciuc un al doilea balon Erlenmyer de aceiaşi capacitate dar în care nu se introduce frunză sau ramură cu frunze. Acest balon serveşte ca probă martor. Baloanele astfel pregătite se aşează la lumina soarelui sau a unui bec electric timp de 30 de minute.

După trecerea acestui interval de timp, se scot dopurile, se scoate frunza sau ramura cu frunze şi se introduc în cele două baloane cîte 2—3 picături de fenolftaleină (soluţie alcoolică 1%) şi 20 ml de $Ba(OH)_2$ N/50. Se astupă din nou baloanele cu dopurile şi se agită timp de 15 minute pentru ca tot dioxidul de carbon rămas în aerul din ele să reacţioneze cu $Ba(OH)_2$. Se scot apoi dopurile de cauciuc de la fiecare balon şi se titrează excesul de $Ba(OH)_2$ cu HCl N/50.

La titrarea $Ba(OH)_2$ din balonul de experienţă se va consuma o cantitate mai mare de HCl decît la balonul martor, deoarece în balonul de experienţă o parte din dioxidul de carbon a fost folosit în fotosinteză.

Cantitatea de dioxid de carbon asimilat de plantă în fotosinteză se calculează după formula :

$$I.f. = \frac{(a—b)°f \cdot 0{,}224 \cdot 60 \cdot 100}{S.t}$$ în care :

I.f. = intensitatea fotosintezei în cm^3 $CO_2/dm^2/h$.

a = numărul de mililitri de HCl N/50 folosiți la titrarea probei de experiență.

b = numărul de mililitri de HCl N/50 folosiți la titrarea probei martor.

f = factorul soluției de HCl N/50

S = suprafața frunzei în cm^2.

t = durata experienței în minute

0,224 = cantitatea de CO_2 care corespunde la 1 ml HCl exact N/50 în cm^3.

60 = numărul de minute dintr-o oră.

100 = coeficient pentru raportarea intensității fotosintezei la 1 dm^2.

13.4.9. INFLUENȚA FACTORILOR EXTERNI ASUPRA INTENSITĂȚII FOTOSINTEZEI

Dintre factorii externi care influențează intensitatea fotosintezei cei mai importanți sînt lumina (care influențează fotosinteza atît prin intensitate cît și prin calitate), concentrația de CO_2 și temperatura.

Influența acestor factori se poate evidenția experimental, în condiții de laborator cu ajutorul plantelor acvatice superioare submerse folosind metoda bulelor.

13.4.9.1. Influența intensității luminii

Se știe că fotosinteza începe la cele mai mici intensități de lumină, crește în intensitate odată cu creșterea intensității luminii pînă la o anumită intensitate luminoasă după care rămîne relativ constantă pentru ca la intensități mari de lumină intensitatea fotosintezei să scadă.

Modul de lucru. Se iau ramuri de plante acvatice submerse (Elodea, Miriophyllum, Ceratophyllum etc.), se secționează oblic cu o lamă de ras astfel încît să aibă o lungime de 6—10 cm după care se introduc cu vîrful în jos în cîte o eprubetă umplută cu apă, avînd grijă ca suprafața de secțiune să nu atingă pereții eprubetelor. Eprubetele astfel pregătite se introduc într-un stativ și se așează la lumina unui bec electric, la o distanță de aproximativ 20 de cm de acesta și se așteaptă pînă cînd încep să degaje bule de oxigen. Pentru experiență se alege o ramură care degajă un număr constant de bule, cuprinse între 20—40/minut.

Punerea în evidență a influenței intensității luminii asupra intensității fotosintezei se face plasînd stativul cu eprubeta ce conține ramura aleasă pentru determinări la distanțe diferite de sursa de lumină (de exemplu 20 ; 30 ; 40 ; 50 și 60 cm) și numărînd bulele emise pe minut pentru fiecare din aceste distanțe.

Se va constata că numărul de bule degajate într-un minut scade pe măsură ce stativul este îndepărtat de sursa de lumină datorită scăderii intensității luminii.

Dacă pe parcursul determinărilor degajarea de bule de către ramură se dereglează sau emisiunea de bule încetează, experiența trebuie reluată cu o nouă ramură.

13.4.9.2. Influența compoziției spectrale a luminii asupra intensității fotosintezei

Fotosinteza este influențată de radiațiile spectrului vizibil pe care plantele le absorb cu ajutorul pigmenților asimilatori, pigmenți caracteristici diferitelor grupe de plante fotoautotrofe.

Evidențierea influenței diferitelor radiații ale spectrului asupra intensității fotosintezei se poate face cu ajutorul unor filtre de sticlă, de celofan colorat sau cu ajutorul unor soluții colorate ale căror culori corespund culorilor spectrului vizibil.

Modul de lucru. Pentru determinare se folosesc ramuri de plante acvatice submerse pregătite după procedeul prezentat în experiența anterioară. Stativul cu eprubeta cu planta aleasă pentru determinări se așează la 20—30 cm de sursa de lumină. Între sursa de lumină și eprubetă se intercalează pe rînd filtrele colorate numărînd de fiecare dată numărul de bule degajate pe minut. După fiecare determinare înainte de a schimba filtrul se verifică dacă în lumina becului ramura degajă numărul inițial de bule și numai după aceea se schimbă filtrul cu unul de altă culoare. Rezultatele obținute se notează într-un tabel iar la sfîrșitul experienței se pot reprezenta grafic.

13.4.9.3. Influența concentrației de CO_2 asupra intensității fotosintezei

În condiții naturale concentrația de CO_2 este de 0,03%, concentrație care s-a dovedit a fi suboptimală fapt pentru care ea reprezintă un factor limitant al fotosintezei.

Modul de lucru. Se numără bulele degajate de o ramură de Elodea canadensis ținută într-o eprubetă cu apă de robinet. Determinăm apoi numărul de bule degajat de aceeași ramură trecută într-o eprubetă cu apă distilată de aceeași temperatură ca și apa de robinet și la aceeași distanță față de sursa de lumină. Se va constata că în apă distilată ramura nu va degaja bule sau va degaja un număr mic datorită dizolvării unei cantități de CO_2 din aer în timpul experienței. Dacă în eprubeta cu apă distilată introducem cu ajutorul unei baghete o cantitate mică de $NaHCO_3$ (care reprezintă o sursă de CO_2) vom constata o intensificare a degajării de bule.

13.4.9.4. Influența temperaturii asupra intensității fotosintezei

Temperatura influențează și ea intensitatea fotosintezei intervenind în viteza de desfășurare a reacțiilor fazei de întunerec a fotosintezei (mai ales prin intermediul activităților enzimatice) cît și asupra viscozității celulelor asimilatoare.

Modul de lucru. Se ia o eprubetă cu apă de robinet în care se introduce o ramură secționată de Elodea canadensis și un termometru pentru a determina temperatura apei. După ce planta degajă un număr constant de bule pe minut notăm numărul de bule degajat după care trecem planta într-o altă eprubetă cu apă încălzită astfel încît temperatura apei să fie cu 10°C mai mare decît în prima eprubetă. Se introduce eprubeta în stativ în locul celeilalte și se numără bulele degajate pe minut. Se va constata că numărul de bule degajat de plantă în unitatea de timp va fi mai mare. În acest fel putem urmări influența temperaturii asupra intensității fotosintezei folosind apă la temperaturile de 10°C, 20°C, 30°C, 40°C și 50°C. Rezultatele obținute se trec într-un tabel și pot fi apoi reprezentate grafic notînd pe ordonată intensitatea fotosintezei (exprimată în număr de bule/minut), iar pe abscisă temperatura (în °C).

13.5. RESPIRAȚIA PLANTELOR

Substanțele organice produse în cursul fotosintezei înmagazinează energia luminii solare sub formă de energie chimică potențială. Această energie este eliberată în cea mai mare parte prin procesul de respirație celulară în urma unor reacții de oxidare respiratorie și într-o măsură mai mică prin procese de fermentație și hidroliză a substanțelor complexe în substanțe mai simple. Energia eliberată este folosită de plante în desfășurarea fenomenelor vitale sau este degajată sub diferite forme de energie ca de exemplu energie calorică, electrică, luminoasă etc.

În cursul respirației are loc un schimb de gaze care se soldează cu oxidarea completă a substanțelor organice folosite în respirație pînă la CO^2 și H_2O, cu eliberarea completă a energiei conținute conform următoarei reacții globale : $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 674$ Kcal.

13.5.1. EVIDENȚIEREA SCHIMBULUI DE GAZE CARACTERISTIC RESPIRAȚIEI

Așa după cum se poate observa și din reacția globală a respirației în acest proces fiziologic se absoarbe oxigen și se degajă dioxid de carbon.

Modul de lucru. Într-un balon cu tubulură laterală se introduc semințe germinate și o eprubetă mică cu NaOH sau KOH 20—30%. La tubulura laterală a balonului se atașază cu ajutorul unei garnituri de cauciuc un tub subțire de sticlă îndoit la partea de sus în unghi drept. Capătul inferior al acestui tub se introduce într-un pahar cu apă colorată iar gura balonului se închide cu ajutorul unui dop (fig. 147).

Semințele respirînd vor consuma oxigen și vor elimina dioxid de carbon care va fi fixat de soluția de hidroxid din eprubetă astfel că datorită consumării oxigenului din aerul din balon va scădea presiunea în interiorul balonului iar apa colorată va urca în tubul vertical.

13.5.2. DETERMINAREA INTENSITĂȚII RESPIRAȚIEI PRIN METODA BOYSEN-JENSEN

Prin această metodă intensitatea respirației se determină după cantitatea de dioxid de carbon produs de materialul vegetal ținut într-un volum de aer închis.

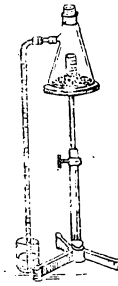


Fig. 147 — Metoda Godlevskl.

Modul de lucru. Se iau două borcane cu capacitatea de 500—1000 cm^3 pe fundul cărora se introduc cîte 20 ml de soluție de $Ba(OH)_2$ 7% și cîteva picături de fenolftaleină (soluție alcoolică 1%), după care unul din ele se închide imediat (el reprezentînd proba de control) iar în celălalt se introduce materialul vegetal a cărei intensitate a respirației o determinăm în așa fel ca acesta să stea deasupra soluției de hidrat. Pentru aceasta materialul vegetal (de regulă semințe germinate) se pune într-o bucată de tifon care se leagă cu o ață și se suspendă deasupra soluției din borcan. Se pune dopul în așa fel ca el să prindă ața de care este suspendat materialul vegetal iar capătul ei să rămînă în afara borcanului.

Dacă materialul vegetal conține clorofilă, borcanul se învelește cu hîrtie neagră sau se ține la întuneric. Se lasă borcanele timp de o oră în repaus, clătinîndu-le din timp în timp pentru a sparge crusta de carbonat de bariu care se formează prin fixarea dioxidului de carbon de către hidroxidul de bariu. După trecerea acestui interval de timp se scoate materialul vegetal din borcan și se titrează excesul de hidroxid de bariu 7% cu o soluție de acid oxalic 2,8636% folosind o biuretă. Se titrează apoi și excesul de hidroxid de bariu din borcanul de control. La titrarea hidroxidului de bariu din borcanul de experiență se va consuma o cantitate mai mică de acid oxalic, de exemplu 15 ml, decît la borcanul de control, de exemplu 18 ml, cantitatea de dioxid de carbon emis de materialul vegetal luat în experiență va fi diferența dintre proba de control și cea de experiență, adică 18—15 = 3 cm^3. Dacă presupunem că s-a lucrat cu 10 g de material vegetal și intensitatea respirației trebuie să se exprime în cm^3 CO_2/g/h se fac următoarele calcule :

10 g. mat. vegetal . . . . . 3 cm^3 CO_2
1 g. mat. vegetal . . . . . X cm^3 CO_2

$$X = \frac{3 \cdot 1}{10} = 0{,}3 \text{ cm}^3 \text{ CO}_2\text{/g/h}.$$

13.5.3. PUNEREA ÎN EVIDENȚĂ A RESPIRAȚIEI ANAEROBE LA PLANTELE SUPERIOARE

În lipsa oxigenului molecular plantele își procură energia enecesară vieții printr-o respirație anaerobă care constă în degradarea substanțelor complexe în substanțe mai simple, cu eliberarea de energie. Astfel de exemplu molceulele de glucoză sînt descompuse în alcool etilic și diodix de carbon.

Modul de lucru. Se umple o eprubetă cu mercur, se astupă eprubeta cu degetul și se răstoarnă cu gura în jos într-un cristalizor cu mercur, în așa fel încît în eprubetă să un pătrundă aer. Se fixează eprubeta într-un stativ iar prin gura eprubetei, scufundată în mercur, se introduc 4—5 semințe de porumb îmbibate cu apă. Acestea se vor ridica în partea de sus a eprubetei (fig. 148). După 30—60 de minute se

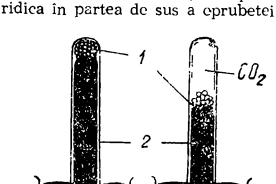


Fig. 148 — Demonstrarea respirației intramoleculare: 1 — semințe; 2 — mercur.

constată că mercurul din eprubetă începe să coboare datorită dioxidului de carbon eliminat de către semințe. Pentru a demonstra că gazul din eprubetă este dioxid de carbon se introduc în ea 1—2 pastile de KOH sau NaOH constatîndu-se că imediat mercurul va urca în eprubetă datorită fixării dioxidului de carbon de către hidroxidul introdus.

Dacă lăsăm experiența astfel montată peste 24 de ore, fără a introduce hidroxid, vom constata după scoaterea eprubetei din mercur, că semințele și gazul rămas în eprubetă miros a alcool.

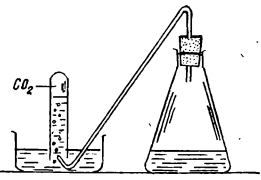
13.5.4. EVIDENȚIEREA FERMENTAȚIEI ALCOOLICE

Fermentația alcoolică reprezintă un caz perticular de respirație anaerobă întîlnit în mod curent la drojdii care fermentează soluțiile zaharate cu producere de alcool etilic, dioxid de carbon și energie.

Modul de lucru. Se ia un pahar Erlenmeyer de 250 ml. și se umple pe jumătate cu o soluție de zaharoză 10% peste care se adaugă 10 ml suspensie de drojdie de bere. Se astupă paharul cu un dop de cauciuc, în care se fixează unul din capetele unui tub de sticlă îndoit în formă de S. Celălalt capăt al tubului se introduce într-un cristalizor cu apă. Pentru grăbirea fermentației, paharul Erlenmeyer se introduce într-un cristalizor cu apă la 30—35°C. După 10—20 de minute dioxidul de carbon eliberat în timpul fermentației începe să se degaje sub formă de bule prin tubul îndoit în formă de S (fig. 149).

Pentru a demonstra că bulele de gaz degajate sînt de dioxid de carbon procedăm, în felul următor: luăm o eprubetă plină cu o soluție

Fig. 149 — Punerea în evidență a CO_2 rezultat din fermentația alcoolică



diluată de hidroxid de bariu în care punem 1—2 picături dintr-o soluție alcoolică de fenolftaleină 1%. În mediu bazic fenolftaleina are culoarea roșie deci conținutul eprubetei se va colora în roșu. Se astupă eprubeta cu degetul și se răstoarnă deasupra tubului de sticlă din cristalizorul cu apă (fig. 150) în așa fel încît să nu pătrundă aer în eprubetă. Dioxidul de carbon degajat este captat de hidroxidul de bariu care reacționează cu el producînd carbonat de bariu și pe măsură ce hidroxidul este transformat în acest mod conținutul eprubetei se decolorează pînă la dispariția completă a culorii (în momentul cînd tot hidroxidul a reacționat cu dioxidul de carbon degajat în fermentație).

Alcoolul etilic rezultat în urma fermentației se poate evidenția în felul următor : se lasă lichidul să fermenteze pînă a doua zi cînd se adaugă puțin NaOH 10%, se încălzește la aproximativ 60°C după care se introduc în balon cîteva cristale de iod. În prezența alcoolului etilic se formează iodoformul sub forma unui precipitat fin galben cu miros caracteristic.

13.6. CREȘTEREA PLANTELOR

13.6.1. DETERMINAREA FACULTĂȚII ȘI ENERGIEI GERMINATIVE

Atunci cînd se efectuează proba germinației se asigură semințelor condiții optime de umiditate, temperatură și aerare și se urmărește numărul de semințe care germinează (în %) acesta reprezentînd facultatea germinativă și viteza cu care se declanșează procesul de germinație, aceasta reprezentînd energia germinativă.

Modul de lucru. Pentru determinarea capacității de germinație în cazul grîului se lucrează cu 400 de cariopse repartizate în patru repetiții de cîte 100 de cariopse. În cazul semințelor mai mari (de exemplu cele de porumb) se lucrează cu 200 boabe repartizate în patru repetiții de cîte 50 de boabe.

Se iau patru cutii Petri cu diametrul de 20 cm. și se introduce în fiecare cîte o hîrtie de filtru pe care se desenează cu creionul 1 dm^2 care se divide în 100 de pătrățele cu latura de 1 cm.

Se aleg cariopse de grîu intacte și se așează cu ajutorul unei pense cîte o cariopsă în fiecare din cele 100 de pătrățele desenate pe hîrtia de filtru. Apoi cu ajutorul unei pipete se îmbibă hîrtia de filtru cu apă se pune capacul pe care se notează data. Cutiile Petri se păstrează la temperatura camerei controlîndu-se zilnic umiditatea și umectîndu-se ori de cîte ori este nevoie.

Ambii indici atit energia cît și facultatea germinativă sînt dați de valoarea procentuală a semințelor germinate în anumite intervale de timp. Pentru facultatea germinativă timpul este astfel măsurat încît după expirarea lui, în general, nu mai germinează nici o sămînță (din cele negerminate pînă atunci). Pentru aprecierea energiei germinative numărătoarea se face după un interval cuprins între 1/3 pînă la 1/2 din durata stabilită pentru determinarea facultății germinative. Aceste termene variază în funcție de specie, de temperatură și de tratamentele prealabile.

Conform normelor laboratoarelor de control al semințelor la grîu energia germinativă se determină după 3 zile de la montarea experienței iar facultatea germinativă după 7 zile.

La prima numărătoare se numără și se îndepărtează din cutia Petri semințele germinate normal precum și cele putrezite iar restul se lasă la germinat pînă la al doilea termen (7 zile).

Se consideră germinate semințele care prezintă radicule și tulpini normale. Radicula se consideră normală dacă are lungimea semînței iar tulpiniță dacă atinge 1/2 din lungimea semînței.

Numărarea se face la fiecare repetiție în parte după care se face media numărătorilor care se exprimă în procente. Ea reprezintă valoarea energiei germinative.

13.6.2. CORELAȚIA DINTRE CANTITATEA DE ENDOSPERM A SEMINȚELOR ȘI CREȘTEREA PLANTULELOR

Atunci cînd semințele germinează, embrionul se dezvoltă pe seama substanțelor de rezervă din endosperm așa încît pînă la formarea rădăcinilor și frunzelor creșterea plantelor este dependentă de cantitatea de endosperm a semințelor.

Modul de lucru. Se aleg semințe sănătoase cu embrionul intact și se pun la înmuiat într-un vas cu apă. Apoi se iau patru loturi de cîte 10 semințe și se procedează în felul următor : se așează 10 semințe întregi într-o cutie Petri pe o hîrtie de filtru îmbibată cu apă. La al doilea lot de 10 semințe se îndepărtează cu o lamă de ras cîte 1/4 din endosperm, la al treilea lot se îndepărtează 1/2 din endosperm iar la al patrulea lot 3/4 din enposperm. Fiecare din aceste loturi se pun la germinat în cîte o cutie Petri pe hîrtia de filtru îmbibată cu apă. Se pun capacele pe care se notează varianta (1/1, 3/4, 1/2 și 1/4 endosperm lăsat împreună cu embrionul), data și clasa. Cutiile Petri se păstrează în laborator la întuneric timp de o săptămînă verificînd zilnic umiditatea hîrtiei de filtru.

După o săptămînă se va constata o creștere diferită a plantelor în funcție de cantitatea de endosperm pe care plăntuța a avut-o la dispoziție.

Pentru stabilirea corelației dintre cantitatea de endosperm și creșterea plăntuțelor se măsoară cu rigla lungimea rădăcinițelor și tulpinițelor pe fiecare variantă a experienței calculîndu-se lungimea medie a celor două organe la fiecare variantă. Cu aceste valori se va construi un grafic cu două curbe (una pentru rădăcină și cealaltă pentru tulpină) funcție de cantitatea de endosperm din fiecare din cele patru variante.

13.6.3. AFLAREA POZIȚIEI ZONELOR DE CREȘTERE LA DIFERITE ORGANE PRIN METODA DIVIZIUNILOR CU TUȘ

Organele plantelor superioare nu cresc în mod uniform pe toată întinderea lor, ele prezentînd două zone distincte de creștere :

— *zona creșterii meristematice* — este o zonă ce se reînoiește fără întrerupere și în care celulele se divid continuu dar nu-și măresc în mod perceptibil volumul.

— *zona creșterii prin întindere* — în această zonă celulele își măresc mult volumul, mai ales pe socoteala apei care pătrunde în celule. În experiențele care urmează se va determina localizarea zonei de creștere prin întindere la rădăcină, tulpină și frunze.

13.6.3.1. Zona de creștere la rădăcină

Se lucrează cu 2—4 semințe germinate cu rădăcini drepte și viguroase de 1—2 cm lungime (rădăcini drepte se obțin prin așezarea semințelor îmbibate cu apă în rumeguș umed astfel ca radicula să iasă direct în jos fără să se curbeze).

Se scot semințele germinate din rumeguș, se șterg cu hîrtie de filtru și se marchează cu tuș din milimetru în milimetru pe o distanță de 10 milimetri de la vîrf (fig. 150, I). Rădăcinile odată marcate se trec semințele într-o cameră umedă (de exemplu un vas dreptunghilar de sticlă) la întuneric timp de 24 de ore.

După 24 de ore se măsoară distanțele dintre diviziuni stabilindu-se creșterea fiecăreia din cele 10 diviziuni inițiale. Se va constata că primul milimetru de la vîrf și ultimii 4—5 milimetri nu și-au modificat lungimea (fig. 18, II) de unde concluzia că zona de creștere prin alungire a rădăcinii este subterminală și se întinde între milimetrul 2 și următorii 5—6 milimetri, creșterea maximă realizîndu-se între milimetrul 2 și 4.

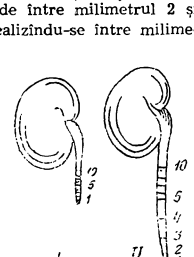


Fig. 150 — Împărțirea rădăcinii în diviziuni milimetrice pentru determinarea zonei de creștere : I — aspectul inițial ; II — după 24 de ore.

13.6.3.2. Zona de creștere la tulpinile nearticulate

Se seamănă într-un ghiveci cu rumeguș semințe de foarea soarelui și de mazăre și se cresc 5 zile la întuneric la o temperatură de 20—25°C. Se lasă apoi cîte două plăntuțe din fiecare, de aproximativ 4 cm înălțime iar restul plăntuțelor se scot din ghiveci.

Cîte o plăntuță din fiecare specie se marchează de sus pînă jos cu diviziuni cu tuș din milimetru în milimetru. Celelalte două plăntuțe care servesc drept martor se marchează cu cîte o singură linie la 2 cm de la vîrf. După 1—2 zile de creștere în întuneric și o temperatură de 20—25°C, se observă că semnele s-au îndepărtat unele de altele mai ales la vîrf în timp ce la bază ele au rămas la distanța inițială 1 mm).

La tulpină zona de creștere se întinde pe o distanță mai mare decît la rădăcină (cîțiva cm iar la unele plante chiar cîteva zeci de cm).

13.6.3.3. Zona de creștere la frunze

Limbul frunzei prezintă întîi o creștere apicală care încetează curînd și locul ei este luat de o creștere bazală (la monocotiledonate) și creștere bazală plus laterală (la dicotiledonate).

Pentru a demonstra acest lucru se alege una din frunzele tinere, abia pe sfert dezvoltată de la o plantă de fasole. Fără să o desprindem de pe plantă se trasează pe fața superioară linii verticale și orizontale astfel încît să se obțină niște pătrățele cu latura de 2 mm. După 4 zile se constată o deformare a pătrățelelor trasate cu tuș mai ales către baza limbului și pe cele două laturi limbul frunzei avînd o creștere difuz bazală.

13.6.4. MĂSURAREA CREȘTERII CU MICROSCOPUL ORIZONTAL

Cu ajutorul microscopului orizontal, dotat cu un micrometru ocular se pot măsura mișcările foarte mici de alungire a vîrfului unui organ în creștere. Metoda prezintă avantajul că este foarte rapidă (datorită amplificării creșterii) și planta crește în condiții normale nefiind influențată în mod mecanic ca de exemplu în cazul folosirii auxanometrelor.

Modul de lucru. Se aleg semințe germinate la care rădăcina și coleoptilul sînt drepe, se fixează plantula cu vată și se introduce cu rădăcina într-o eprubetă (cu apă pe fund) în așa fel încît vata să servească drept dop. Se prinde eprubeta într-un stativ metalic și se apropie de ea tubul microscopului prinzînd vîrful rădăcinii pe scara verticală a micrometrului ocular în dreptul diviziunii zero după care se fac trei citiri la interval de 10 minute fiecare. Se face media acestor citiri, valoarea obținută servind la calcularea vitezei de creștere. Pentru a calcula viteza de creștere a rădăcinii trebuie să se afle valoarea unei diviziuni a micrometrului ocular în milimetri.

Acest lucru se realizează prin fixarea unei rigle în stativul metalic și aflarea numărului de diviziuni de pe micrometrul ocular care acoperă 1 mm de pe riglă (la numărătoare intră și diviziunile corespunzătoare grosimii uneia din cele două linii care delimitează 1 mm de pe riglă). Dacă de exemplu acest număr este egal cu 50 de diviziuni rezultă că o diviziune va avea 0,02 mm.

Cunoscînd valoarea unei diviziuni și numărul de diviziuni cu care rădăcina crește în medie într-un interval de timp de 10 minute se calculează viteza de creștere în mm/h.

Pentru determinarea vitezei de creștere a coleoptilului se procedează în mod asemănător.

13.7. MIȘCĂRILE PLANTELOR

Excitabilitatea și mișcarea, caractere de bază ale materiei vii, sînt mai puțin dezvoltate la plante decît la animle deoarece plantele nu au un sistem nervos iar o mare parte dintre ele sînt fixate în sol. Cu toate acestea mișcările plantelor, deși aparent reduse în comparație cu mișcările animalelor, reprezintă un fenomen destul de răspîndit în lumea plantelor și totodată foarte divers ca forme de manifestare și mecanisme de execuție.

Pentru clasificarea diferitelor tipuri de mișcări la plante se apelează în general la următoarele criterii :

— natura structurilor care participă la mișcare : organite celulare, celule izolate sau organe întregi ;

— intervenția sau neintervenția unui factor extern în declanșarea mișcării ;

— prezența sau absența unui fenomen de creștere pentru ca mișcarea să aibă loc.

În funcție de aceste criterii mișcările plantelor pot fi : mișcări cu mecanisme fizice (mișcări prin imbibație și coeziune) ; mișcări citoplasmatice (mișcări ale citoplasmei și organitelor citoplasmatice) ; mișcări ale celulelor izolate (mișcări autonome și mișcări provocate-tactisme-) ; mișcări ale organelor plantelor fixate (tropisme, nastii și nutații).

13.7.1. CURENȚII PROTOPLASMATICI

Dat fiind faptul că acest fenomen a fost observat la celulele unor plante aparținînd la diferite grupe sistematice s-a ajuns la concluzia că ar fi vorba de un caracter general al citoplasmei.

Modul de lucru. Mișcarea protoplasmei se observă la microscop studiind materialul vegetal pus într-o picătură de apă între lamă și lamelă. Ne dăm seama de deplasarea protoplasmei urmărind mișcarea unor particule vizibile la microscop care sînt antrenate în mișcarea ei. Astfel de particule vizibile sînt cloroplastele.

Curenții protoplasmatici care antrenează în mișcarea lor cloroplastele se pot observa foarte ușor la frunzele de Elodea canadensis mai ales la celulele din vecinătatea nervurii mediane.

13.7.2. GEOTROPISMUL

Organele plantelor se orientează diferit față de direcția și sensul forței de atracție a pămîntului. Astfel rădăcina și tulpina principală se orientează paralel cu forța de atracție ele fiind organe ortogeotrope. Rădăcina se orientează spre forțe mai mari de atracție fiind pozitiv ortogeotropă în timp ce tulpina se orientează spre forțe mai mici de atracție ea fiind negativ ortogeotropă.

Modul de lucru. Pe un dop de plută se fixează cu ajutorul unor ace cu gămălie niște semințe de porumb germinate în pozițiile : normală (cu tulpinița în sus și rădăcinița în jos), răsturnată și orizontală. Dopul în care au fost înfipte semințele se așează într-o farfurioară cu apă și se acoperă cu un clopot de sticlă (fig. 151).

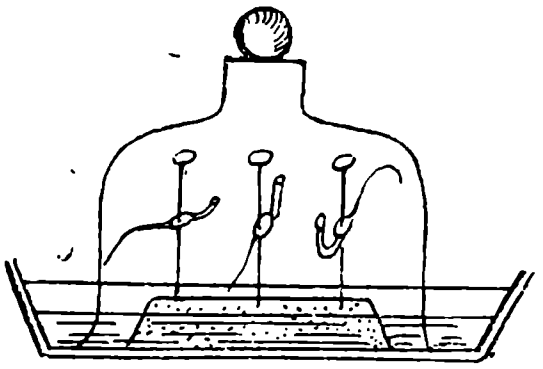


Fig. 151 — Dispozitiv pentru observarea geotropismului.

După 12—24 de ore se observă că în toate cele trei cazuri rădăcina este îndreptată în jos iar tulpina în sus, aceasta datorită mișcărilor geotrope care se realizează prin creșterea neuniformă a celulelor celor două fețe ale organelor : la rădăcină cresc mai intens celulele de pe fața superioară ceea ce face ca rădăcina să se orienteze pozitiv ortogeotrop iar la tulpină lucrurile se petrec invers ea fiind negativ ortogeotropă.

13.7.3. FOTOTROPISMUL

Fototropismul este o mișcare de orientare a plantelor față de lumină, mișcare ce se realizează tot prin diferență de creștere a celulelor de pe cele două fețe ale unui organ (fața expusă luminii și fața opusă acesteia).

Modul de lucru. Se cresc plăntuțe de ovăz în ghivece de pămînt pe un singur rînd — în mijlocul ghiveciului. Cînd coleoptilele ating 2—3 cm începe experiența. Unui coleoptil i se retează vîrful (cam 3 mm din vîrf), altuia i se acoperă vîrful cu un capișon de staniol de 3—4 mm lungime, la alt coleoptil se acoperă un staniol partea bazală, iar altul este lăsat liber (fig. 152 a). Ghiveciul se introduce sub o cutie dreptunghiulară de lemn sau de carton căptușită la interior cu hîrtie neagră și care are pe una din laturi un orificiu circular cu diametrul de 2 cm. După 6—12 ore se constată că la coleoptilele cu vîrful tăiat și la cele cu vîrful acoperit cu staniol nu se produce curbura fototropică. Ea se produce doar la coleoptilele libere și la cele care au baza acoperită, vîrful acestora din urmă fiind curbat spre orificiul prin care a pătruns lumina (fig. 152 b).

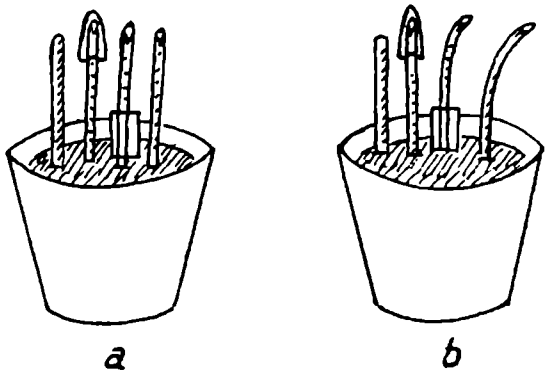


Fig. 152 — Punerea în evidență a fototropismului și a zonei de percepere a luminii : a — aspectul inițial ; b — după 6—12 ore de ședere în camera fototropă.

Prin această experiență se evidențiază atît producerea curburilor fototrope cît și zona de percepere a luminii, aceasta fiind situată la vîrful coleoptilelor.

13.7.4. CHIMIOTROPISMUL RĂDĂCINILOR

Chimiotropismul reprezintă mișcări de curbură provocate de concentrația neegală a unei substanțe chimice pe cele două fețe opuse ale unui organ. Atunci cînd acesta se curbează spre concentrația mai mare avem de a face cu un chimiotropism pozitiv iar cînd se curbează spre concentrația mai mică cu un chimiotropism negativ.

Modul de lucru. Pentru evidențierea chimiotropismului trebuie să realizăm un dispozitiv în care concentrația substanței care acționează asupra rădăcinilor să fie mai mare pe o față a ei decît pe cea opusă. Acest dispozitiv se realizează astfel : în două vase de sticlă cu deschidere largă punem o soluție fierbinte de gelatină 6—8% după ce am fixat în mijlocul lor cîte o eprubetă ; după ce soluția s-a întărit turnăm apă fierbinte în eprubete pentru a le putea scoate fără a rupe gelul ; golul rămas în centrul gelului îl umplem cu soluția de cercetat : într-un vas punem o soluție 2% de $(NH_4)2HPO_4$ sau $NH_4H_2PO_4$ iar în celălalt o soluție de NaCl 2,5%. În jurul scobiturii cu soluție se introduc vertical rădăcinile unor plante de lupin sau mazăre (se pot face în prealabil canale cu un ac de împletit, încălizit). Vasele se așează într-un vas mai mare cu puțină apă și sugativă lipită pe pereți pentru a menține umezeala. Vasele astfel montate se păstrează la întuneric. După cîteva zile se observă că rădăcinile s-au curbat : sub influența fosforului către scobitura cu soluție (chimiotropism pozitiv) sub influența clorurii de sodiu către pereții vasului (chimiotropism negativ) (fig. 153).

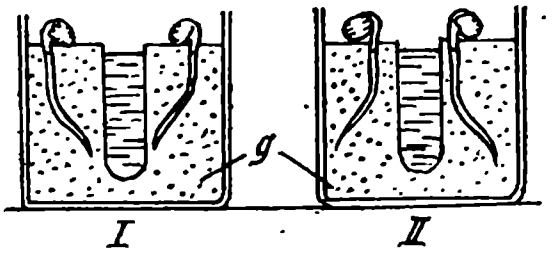


Fig. 153 — Evidențierea chimiotropismului rădăcinilor : I — reacție pozitivă față de fosfatul de amoniu ; II — reacție negativă față de NaCl ; g — gelatină.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVA

ANDREI M., ANGHEL I., POPESCU I., STOICA E., 1979. *Lucrări practice de botanică.* Ed. didactică și pedagogică, București.

ANDREI M., ANGHEL I., POPESCU I., STOICA E., 1981. *Lucrări practice de biologie vegetală.* Editura didactică și pedagogică, București.

ANDREI M., RĂDULESCU DIDONA, 1973. *Caiet pentru tehnica preparării și conservării materialului biologic.* Tipogr. Univ. București.

ANGHEL I., TUDOR C., MEȘTER L., NĂSTĂSESCU M., NIȚESCU E., GREGORIAN L., TOMA N., UNTU C., 1975. *Practicum de biologie.* Universitatea din București.

ANGHEL I., TOMA N., 1975. *Citologie vegetală. Tehnici și metode de laborator.* Universitatea din București.

ANGHEL I., 1979, *Citologie vegetală,* Ed. didactică și pedagogică, București.

ANGHEL I., TOMA N., 1980, *Poliploidia și aneuploidia.* Ed. științifică și enciclopedică, București.

ANGHEL I., BREZEANU AURELIA, TOMA N., 1981, *Ultrastructura celulei vegetale. Atlas.* Ed. Academiei R. S. România.

ANGHEL I., TOMA N., BREZEANU AURELIA, 1981. *Practicum de citologie vegetală.* Universitatea din București.

ANGHEL I., TOMA N., VASSU TATIANA, MOISA I., CÎRCIUMĂRESCU DOINA, 1985. *Genetica microorganismelor. Principii și tehnici de laborator.* Universitatea din București.

ANGHEL I., TOMA N., 1987. *Cromozomii.* Ed. științifică și enciclopedică, București.

BAKER J. R., 1969. *Cytological Technique.* Methuen & Ltd. and Science Paperbacks.

BOLDOR O., RAIANU O., TRIFU M., 1983, *Fiziologia plantelor — lucrări practice.* Ed. didactică și pedagogică București.

CASSELMAN %. G. B., 1959, *Histochemical tehnique,* Methuen, London.

CUPCEA EMILIA, ILIESCU EMILIA, BOLDOR O., BROGOVITZKY EDIT, PETREA V., POPOVICI M., SOARE FLORICA, 1969, *Lucrări practice de Fiziologia plantelor,* Edit. didactică și pedagogică, București.

DARLINGTON C. D., 1963, *Chromosomes Botany,* George Allen and Uniwin Ltd. London.

FEDER N., O'BRIEN P. T., 1968, *Plant microtechniques. Some principles and new methods.* Amer. J. Bot., 55, 123—142.

GOLDHAAR L., 1957, *Microfotografia.* Ed. Tehnică, București.

IONESCU VENERA, CRISTUREAN I., 1974, *Lucrări practice de pregătirea materialului biologic (Botanică sistematică),* Universitatea din București.

KIHLMAN B. A., 1966, *Action of chemicals on dividing cells.* Prentice Hall Inc. New Jersey.

LANGERON C., 1942. *Precis de microscopie.* Collection de precis medicaux. Masson et Cie Paris.

LEVAN A., FREDGA K., SANDERG A., 1964, *Nomenclature for centromeric position on chromosomes,* Heriditas 52, 201—220.

MOHAN G., 1982, *Fotografierea la microscop.* Ed. Tehnică București.

MORUZI C. TOMA N., 1971, *Licheni,* Ed. didactică și pedagogică București.

NOUGARÈDE A., 1969, *Biologie vegetală,* tom I, *Citologie.* Ed. Masson et C-ie, Paris.

PIZON P., 1949, *Photomacrographie et Photomicrographie,* Edition Revue d'Optique, Paris.

POPESCU I., VOICA C., *Caiet de lucrări practice de Fiziologia plantelor,* Centrul de multiplicare al Univ. din București.

RABEGA C., RABEGA MARIA, 1975, *Chimia generală.* Ed. didactică și pedagogică București

RAICU P., ANGHEL I., POPESCU CONSTANȚA, DUMA DOINA, NICOLAESCU MARIUCA, TAISESCU ELENA. 1973, *Lucrări practice de genetică,* Universitatea din București.

ȘERBĂNESCU GABRIELA, ANDREI M., MITROIU NATALIA, PETRIA ELENA, 1983, *Practicum de biologie vegetală,* Ed. Ceres București.

TARNAVSCHI I., ȘERBĂNESCU-JITARIU O., MITROIU-RĂDULESCU N., RĂDULESCU D., 1971, *Practicum de morfologie și anatomie vegetală,* Universitatea din București.

TOMA N., SOFONOV A., 1971, *Tehnica întocmirii preparatelor microscopice botanice* (I), *În ajutorul profesorului de biologie,* vol. 2, 27—46.

TOMA N., SOFONOV A., 1972, *Tehnica întocmirii preparatelor microscopice botanice* (II), *În ajutorul profesorului de biologie,* vol. 7, 31—48, București.

TOMA N., ANGHEL I., 1985, *Citologie vegetală,* Universitatea din București.

Dat la cules 11.VII.1988. Bun de tipar 17.XI.1988.
Coli tipografice 20,25. Tiraj 3500 exemplare

Tiparul s-a efectuat sub c-da nr. 278
la Tipografia Universității din București

Lei 40